

**Untersuchung der Belastung von Mäusen
durch unterschiedliche Applikationsmethoden
mit Hilfe telemetrischer Bestimmung physiologischer
Reaktionen sowie mittels Corticosteronanalysen**

von Nina Baier, geb. Reitz

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Untersuchung der Belastung von Mäusen
durch unterschiedliche Applikationsmethoden
mit Hilfe telemetrischer Bestimmung physiologischer
Reaktionen sowie mittels Corticosteronanalysen

von Nina Baier, geb. Reitz

aus Berlin

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde,
Tierhygiene und Tierhaltung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Dr. M. Erhard

Angefertigt in der
Zentralen Versuchstiereinrichtung, Johannes Gutenberg-Universität,
Mainz
und am
Zentrum für Präklinische Forschung, Deutsches Krebsforschungszentrum,
Heidelberg

Mentor:
Prof. Dr. K. Reifenberg

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael Erhard
Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Tag der Promotion: 11. Februar 2017

Meiner Familie,
die mich immer und auf jedem meiner Wege unterstützt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	VIII
Tabellenverzeichnis.....	X
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Die Maus als Tiermodell.....	3
2.2 Belastung der Maus	3
2.2.1 Tierschutzrechtliche Begriffe.....	3
2.2.1.1 Schmerz.....	3
2.2.1.2 Leiden	4
2.2.1.3 Schaden.....	4
2.2.1.4 Angst.....	5
2.2.2 Stressreaktion.....	5
2.2.2.1 Definition	5
2.2.2.2 Stressoren.....	7
2.2.2.3 Biologische Stressachsen	7
2.2.3 Techniken der Belastungseinschätzung beim Versuchstier.....	11
2.3 Telemetrie	15
2.3.1 Entwicklung der Telemetrie.....	15
2.3.2 Telemetrie in der Maus	16
2.4 Injektionsmethoden bei der Maus.....	17
2.4.1 Allgemeines zur Substanzapplikation und Definition	17
2.4.2 Getestete Applikationen.....	19
2.4.2.1 Subkutane Injektion.....	20
2.4.2.2 Intraperitoneale Injektion	20
2.4.2.3 Intravenöse Injektion	21
2.4.2.4 Retrobulbäre Injektion	23
2.4.2.5 Intraplantare Injektion.....	24
2.4.2.6 Schlundsondierung	25
2.5 Zielsetzung und Fragestellungen	25
3 Material und Methoden	26
3.1 Genehmigung	26
3.2 Mausstämme	26
3.3 Haltung und Fütterung.....	26

3.4 Radiotelemetrische Technik	27
3.4.1 Methoden der Radiotelemetrie	27
3.4.2 Implantation des Senders	29
3.4.2.1 Präoperative Maßnahmen	30
3.4.2.2 Transponderimplantation	30
3.4.2.3 Postoperative Maßnahmen	31
3.4.3 Radiotelemetrische Messung	32
3.5 Versuchsdurchführung	32
3.5.1 Gruppeneinteilung der Applikationsmethoden	33
3.5.1.1 Einteilungen der Injektionstechniken	34
3.5.1.2 Einteilungen der retrobulbären Injektion	34
3.5.1.3 Einteilungen der Schlundsondierung	36
3.5.1.4 Einteilungen der subkutanen Injektion während der Dunkelperiode	36
3.5.2 Formen der Applikation	37
3.5.2.1 Subkutane Injektion	37
3.5.2.2 Intraperitoneale Injektion	38
3.5.2.3 Intravenöse Injektion	39
3.5.2.4 Intraplantare Injektion	41
3.5.2.5 Schlundsondierung	41
3.5.3 Corticosteronbestimmung	42
3.5.3.1 Probenentnahme zur Bestimmung des Corticosterongehaltes im Blutserum	42
3.5.3.2 Bestimmung des Corticosterongehaltes im Blutserum	44
3.6 Statistische Auswertung	45
4 Ergebnisse	46
4.1 Experimentelles Design	46
4.2 Ergebnisse der unterschiedlichen Applikationsmethoden	48
4.2.1 Ergebnisse in der akuten Phase	48
4.2.2 Ergebnisse in der Arousalphase	53
4.2.3 Ergebnisse der circadianen Biorhythmen	60
4.2.4 Ergebnisse der retrobulbären Injektion	75
4.2.4.1 Akute Phase	75
4.2.4.2 Arousalphase	76
4.2.4.3 Circadianer Biorythmus	79
4.2.5 Zusammenfassung der Signifikanzen	82
4.3 Ergebnisse der Corticosteronbestimmung	84

4.4 Ergebnisse der subkutanen Injektion in der Nachtperiode	85
5 Diskussion.....	89
5.1 Diskussion der Methode.....	89
5.2 Stammesunterschiede bei der akuten Herzfrequenz	93
5.3 Gesamtvergleich aller telemetrischer Ergebnisse.....	94
5.3.1 Bewertung der sc, iv, ip, ipl Injektionstechniken und der Schlundsondierung	95
5.3.2 Bewertung der retrobulbären Injektion	96
5.4 Belastungsbeurteilung der intraplantaren Injektion anhand der Corticosteronbestimmung	98
5.5 Ausblick: Präliminäre Beurteilung der subkutanen Injektion in der Dunkelperiode	99
6 Zusammenfassung	101
7 Summary	104
Literaturverzeichnis.....	106
Selbstständigkeitserklärung	115
Danksagung	116

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Die SAM- Achse und das sympathikoneurale System.	8
Abbildung 2:	Die HHNA.	10
Abbildung 3:	Elemente der SAM- Achse, des sympathikoneuralen Systems und der HHNA.	11
Abbildung 4:	Querschnitt durch einen Rattenschwanz.	21
Abbildung 5:	Querschnitt durch einen Rattenschwanz bei zwei unterschiedlichen Körpertemperaturen (37° und 40° C).	22
Abbildung 6:	Position der Kanüle im retroorbitalen Sinus bei der retrobulbären Injektion.	23
Abbildung 7:	Käfig Setup der Mäuse im Telemetrier Raum.	27
Abbildung 8:	Transponder des Typs TA11ETA-F10 der Firma DSI.	28
Abbildung 9:	Aufbau der Telemetrieanlage.	29
Abbildung 10:	Fixierungstechnik und Darstellung der subkutanen Injektion bei einer C57BL/ 6J Maus.	38
Abbildung 11:	Fixierungstechnik und Darstellung der intraperitonealen Injektion bei einer C57BL/ 6J Maus.	39
Abbildung 12:	Fixierungstechnik in einem Perspex Restraint und Darstellung der intravenösen Injektion in die Schwanzvene bei einer C57BL/ 6J Maus.	39
Abbildung 13:	Darstellung der retrobulbären Injektion bei einer C57BL/ 6J Maus während der Inhalationsnarkose.	40
Abbildung 14:	Fixierungstechnik und Darstellung der intraplantaren Injektion bei einer C57BL/ 6J Maus.	41
Abbildung 15:	Darstellung der Schlundsondierung bei einer C57BL/ 6J Maus.	42
Abbildung 16:	Akute Phase von C57BL/ 6J Mäusen (sc, iv, ip, ipl, og).	50
Abbildung 17:	Akute Phase von BALB/ c Mäusen (sc, iv, ip, ipl, og).	51
Abbildung 18:	Akute Phase von NMRI Mäusen (sc, iv, ip, ipl).	52
Abbildung 19:	Arousalphase von C57BL/ 6J Mäusen (sc, iv, ip, ipl).	55
Abbildung 20:	Arousalphase von C57BL/ 6J Mäusen (og).	56
Abbildung 21:	Arousalphase von BALB/ c Mäusen (sc, iv, ip, ipl).	57
Abbildung 22:	Arousalphase von BALB/ c Mäusen (og).	58
Abbildung 23:	Arousalphase von NMRI Mäusen (sc, iv, ip, ipl).	59

Abbildung 24:	Circadianer Biorhythmus von C57BL/ 6J Mäusen (sc).....	61
Abbildung 25:	Circadianer Biorhythmus von C57BL/ 6J Mäusen (iv).....	62
Abbildung 26:	Circadianer Biorhythmus von C57BL/ 6J Mäusen (ip).....	63
Abbildung 27:	Circadianer Biorhythmus von C57BL/ 6J Mäusen (ipl).....	64
Abbildung 28:	Circadianer Biorhythmus von C57BL/ 6J Mäusen (og).....	65
Abbildung 29:	Circadianer Biorhythmus von BALB/ c Mäusen (sc).....	66
Abbildung 30:	Circadianer Biorhythmus von BALB/ c Mäusen (iv).....	67
Abbildung 31:	Circadianer Biorhythmus von BALB/ c Mäusen (ip).	68
Abbildung 32:	Circadianer Biorhythmus von BALB/ c Mäusen (ipl).....	69
Abbildung 33:	Circadianer Biorhythmus von BALB/ c Mäusen (og).	70
Abbildung 34:	Circadianer Biorhythmus von NMRI Mäusen (sc).	71
Abbildung 35:	Circadianer Biorhythmus von NMRI Mäusen (iv).	72
Abbildung 36:	Circadianer Biorhythmus von NMRI Mäusen (ip).	73
Abbildung 37:	Circadianer Biorhythmus von NMRI Mäusen (ipl).	74
Abbildung 38:	Akute Phase von C57BL/ 6J Mäusen (rb).....	76
Abbildung 39:	Arousalphase von C57BL/ 6J Mäusen (rb).	78
Abbildung 40:	Circadianer Biorhythmus von C57BL/ 6J Mäusen (rb, 1. Versuch).	80
Abbildung 41:	Circadianer Biorhythmus von C57BL/ 6J Mäusen (rb, 2. Versuch).	81
Abbildung 42:	Corticosteronwerte von C57BL/ 6J Mäusen (ip).....	85
Abbildung 43:	Akute Phase von BALB/ c Mäusen (sc in der Nachtperiode).....	86
Abbildung 44:	Arousalphase von BALB/ c Mäusen (sc in der Nachtperiode).....	88
Abbildung 45:	Zeitliche Darstellung der Intervalle zur Belastungsbeurteilung von Applikationen.....	92
Abbildung 46:	Gewebeschaden nach retrobulbärer Injektion.....	97

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Aktuelle Belastungserfassungsmethoden bei Versuchstieren und ihre Bewertung.	14
Tabelle 2:	Empfohlene maximale Injektionsvolumina bei Versuchstieren.	19
Tabelle 3:	Anzahl der Messungen in den einzelnen Versuchen.	33
Tabelle 4:	Versuchsplan (sc, iv, ip, ipl).	34
Tabelle 5:	Versuchsplan (rb).	35
Tabelle 6:	Versuchsplan (og).	36
Tabelle 7:	Versuchsplan (sc in der Nachtperiode).	37
Tabelle 8:	Anzahl der Messungen pro Zeitpunkt bei der Corticosteronbestimmung.	43
Tabelle 9:	Stammesspezifische Unterschiede der Herzfrequenz in der Zeitspanne nach der Manipulation in der akuten Phase.	53
Tabelle 10:	Zusammenfassung der statistischen Signifikanzen.	83
Tabelle 11:	Die Phasen der Belastungsbeurteilung.	93

Abkürzungsverzeichnis

3R	Replace, Reduce, Refine
A.	Arteria (Arterie)
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Akt	Aktivität
ANOVA	Analysis of variance
AU	Arbitrary Unit (willkürliche Einheit)
BALB/ c	Mausstamm BALB/ c
C57 BL/ 6J	Mausstamm C57BL/ 6J
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
DSI	Data Science International, USA
EKG	Elektrokardiogramm
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
G	Gauge
GV- SOLAS	Gesellschaft für Versuchstierkunde
HF	Herzfrequenz
HHNA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
IASP	International Association for the Study of Pain
IgG	Immunglobulin G
ip	intraperitoneal
ipl	intraplantar
iv	intravenös
KGW	Körpergewicht
M.	Musculus (Muskel)
min	Minute
min ⁻¹	pro Minute
n.e.	nicht ermittelt
n.s.	nicht signifikant
NaCl	Natriumchlorid
NMRI	Mausstamm NMRI
og	oral gavage (Schlundsondierung)
p (A*T)	applikations- und zeitspezifische Signifikanz
p (T)	zeitspezifische Signifikanz
rb	retrobulbär
RM	repeated measures
SAM- Achse	sympatho- adrenomedullären- Achse

sc	subkutan
sec	Sekunde
SEM	standard error of the mean (Standardfehler)
Temp	Körpertemperatur
TMB	3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin
V.	Vena (Vene)

1 Einleitung

Tierversuche gewinnen in verschiedenen Forschungsbereichen immer mehr an Bedeutung. Es wurden im Jahr 2014 in Deutschland ca. 3 Millionen Tiere für Tierversuche verwendet, davon waren ca. 1,9 Millionen Mäuse (BMEL, 2015). Auch weltweit werden Nagetiere vorwiegend für experimentelle Zwecke genutzt (Malakoff, 2000).

Tierversuche werden jedoch heutzutage in der Gesellschaft in ambivalenter Weise gesehen und sind ethisch umstritten. Aus diesem Grunde sind in der wissenschaftlichen Forschung seit geraumer Zeit Bemühungen im Gange, die Zahl der Versuche auf ein Minimum zu reduzieren und die Bedingungen für die Versuchstiere zu verbessern.

In den 1950er Jahren stieg die Nachfrage nach höheren Standards für Tiermodelle. Die Wissenschaft richtete immer mehr ihr Augenmerk auf das Wohlergehen der Labortiere und auf die Qualität der Tierversuche (Baumans, 2004). Dazu haben die Wissenschaftler Russel und Burch bereits 1959 eine Leitlinie eingeführt, die heute als die 3Rs bekannt und international anerkannt ist (Russel und Burch, 1959).

Darin forderten sie eine Reduzierung der Zahl der notwendigen Tierversuche und der Menge der dafür eingesetzten Versuchstiere auf das unbedingt erforderliche Maß (Reduction), den Ersatz von Tierversuchen durch mögliche tierversuchsfreie Alternativen (Replacement) und die ständige Verbesserung des Wohlbefindens von Versuchstieren und von Versuchsabläufen (Refinement).

Im Jahr 2010 wurde mit der Einführung der neuen EU Direktive 2010/63/EU eines der strengsten Tierschutzgesetze weltweit vorgelegt (Cressey, 2008, Abbott, 2010, Vogel, 2010). Zielsetzung der europäischen Gesetzesnovelle war die konsequente Implementierung höchster Standards für die Nutzung von Tieren in der Forschung und eine strenge Berücksichtigung der 3R Richtlinien in Europa (Wells, 2011).

Mit der Gesetzesnovelle kommt der Belastung von Versuchstieren eine wesentlich größere Bedeutung zu.

Bei der Umsetzung der Direktive wurde allerdings klar, dass es keine gesicherten Verfahren zur Beurteilung von Belastung bei Labortieren in Versuchen gibt, insbesondere bei den hauptsächlich in der Labortierkunde verwendeten Nagetieren (Marris, 2009, Barrot, 2012). Die Einschätzung findet vorzugsweise aufgrund von Vergleichen mit dem menschlichen Organismus statt oder beruht auf Beobachtungen von Verhaltensänderungen oder pathologischen Veränderungen und klinischen Symptomen. Somit rückt die Frage nach einer objekti-

ven Einschätzung von Belastungen bei tierexperimentellen Eingriffen für Labornagetiere und Labortiere im Allgemeinen stark in den Vordergrund.

Die vorliegende Arbeit soll eine Belastungserfassung und Belastungseinschätzung von in der Praxis häufig durchgeführten Applikationsmethoden bei Labormäusen anhand telemetrischer Messungen und Serumcorticosteronbestimmung liefern.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Maus als Tiermodell

Tiere als Modellorganismus sind von großer Bedeutung für die biomedizinische Forschung. Die verwendeten Labormäuse stammen von der Wildhausmaus (*Mus musculus*) bzw. deren Unterarten ab. Sie haben eine schnelle Entwicklung, sind mit vier bis sechs Wochen geschlechtsreif, haben eine hohe Wurfgröße mit durchschnittlich 4- 14 Jungtieren und somit eine kurze Generationsfolge. Mäuse sind nachtaktiv mit Aktivitätsperioden während der Dunkelphase. Stammesabhängige Schwankungen im Aktivitätsmuster sind durchaus erkennbar (Van Zutphen et al., 1995). Für Forschungszwecke wurden viele Inzucht- und Auszuchtstämme gezüchtet. Mittlerweile sind mehr als 450 Inzuchtstämme der Maus beschrieben (Beck et al., 2000). Die in dieser Arbeit verwendeten C57BL/ 6J und BALB/ c Inzuchtstämme sowie NMRI Auszuchtstamm sind weltweit in der Forschung häufig genutzte Varianten.

2.2 Belastung der Maus

Der Begriff Belastung findet sich im Tierschutzgesetz nicht. Vielmehr fasst der Begriff die im Tierschutzgesetz formulierten Parameter Schmerz, Leiden und Schaden zusammen. In der EU Direktive 2010/63/EU werden zudem die Begriffe Angst und Stress benutzt. Um überhaupt eine Aussage über die Belastung bei Mäusen treffen zu können, muss eine Definition dieser Begriffe erfolgen. Die allgemein gültigen Definitionen beschreiben dabei die menschliche Wahrnehmung, so dass die Übertragung auf die Tierwelt unter Umständen fraglich ist. Dennoch soll in dieser Arbeit auf folgende Definitionen Bezug genommen werden.

2.2.1 Tierschutzrechtliche Begriffe

2.2.1.1 Schmerz

„Schmerz ist eine unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung verbunden mit tatsächlicher oder potentieller Schädigung eines Gewebes oder die mit Begriffen einer solchen Schädigung von betroffenen Personen beschrieben wird.“ (IASP, 1994)

Diese Schmerzdefinition bezieht sich auf das menschliche Schmerzempfinden, jedoch lassen die sichtbaren Reaktionen auf schmerzauslösende Reize sowie eine mögliche Verringerung einer Schmerzreaktion durch Analgetika eindeutiger darauf schließen, dass es auch ein Schmerzempfinden beim Tier gibt (Le Bars et al., 2001). Betrachtet man die Schmerzauf-

nahme, -weiterleitung und -verarbeitung, so sind diese bei Mensch und Wirbeltier anatomisch und physiologisch ähnlich (ILAS, 1992). Auch das lässt darauf schließen, dass das tierische Schmerzempfinden dem des Menschen nahe kommt. Es gibt zwei häufig angewandte Definitionen für Schmerz beim Tier.

„Schmerz bei Tieren ist eine unwillkommene, sensorische Erfahrung, die protektive motorische Handlungen hervorruft, in erlerntem Meideverhalten resultiert und speziespezifische Verhaltenszüge, einschließlich des Sozialverhaltens, modifizieren kann (Zimmermann, 1986).“

Molony definiert den tierischen Schmerz wie folgt:

“Schmerz ist eine aversive, sensorische und emotionale Erfahrung, die beim Tier das Bewusstsein für die Zerstörung oder Gefährdung seines Körpergewebes auslöst. Zur Schadensreduktion oder Vermeidung wird die Physiologie oder das Verhalten verändert, um die Wahrscheinlichkeit des erneuten Auftretens zu minimieren und die Heilung voranzutreiben.“ (Molony und Kent, 1997)

Basierend auf der Definition der IASP, wurde 2007 eine für das Tier erweiterte Definition von Schmerz von der American Association for Laboratory Animal Science aufgestellt. Diese hebt hervor, dass Mensch und Tier Schmerz ähnlich empfinden.

„Schmerz ist eine unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung, verbunden mit tatsächlicher oder potentieller Schädigung des Gewebes, mit welcher bei einem Tier gerechnet werden muss, wenn Verfahren oder Krankheitsmodelle untersucht werden, die beim Menschen Schmerzen verursachen könnten.“ (Aclam, 2007)

2.2.1.2 Leiden

Nach Lorz und Metzger sind „Leiden alle nicht bereits vom Begriff des Schmerzes umfassten Beeinträchtigungen im Wohlbefinden, die über ein schlichtes Unbehagen hinausgehen und eine nicht ganz unwesentliche Zeitspanne fortauern“ (Lorz und Metzger, 1999). Es kann im engen Zusammenhang mit Schmerz stehen und durch diesen verursacht werden (Hackbarth und Lückert, 2000).

2.2.1.3 Schaden

Von Schaden spricht man dann bei einem Tier, wenn sich der aktuelle Zustand für das Tier kurzzeitig oder dauerhaft verschlechtert, was sowohl auf körperlicher als auch geistiger Ebene geschehen kann (Lorz, 1992). Beispiele für einen Schaden sind nach Lorz und Metzger Abmagerung, Übergewicht, Amputation, Verletzung, Störung der Bewegungsfähigkeit, Stö-

rung des Verhaltens, Gesundheitsschäden, Gleichgewichtsstörung, reduzierte Leistungsfähigkeit, Unfruchtbarkeit etc. (Lorz und Metzger, 1999).

2.2.1.4 Angst

Angst ist ein mit Stress verbundener emotionaler Zustand (ILAS 1992). Angst wird in bedrohlichen Situationen empfunden. Sie ist nützlich, um adäquat auf solche Situationen zu reagieren und so das Überleben zu sichern (Ohman und Mineka, 2001).

2.2.2 Stressreaktion

2.2.2.1 Definition

Das Wort „Stress“ wird häufig verwendet und oft mit etwas Unangenehmen assoziiert (Broom und Johnson, 1993). Moberg zeigte hingegen die psychologisch befriedigende Wirkung von Stress auf und postulierte, dass Stress per se nicht negativ ist und ein Bestandteil vom Leben darstellt (Moberg, 2000).

Die Definition von Stress ist nach wie vor nicht endgültig festgelegt und findet in der Biologie unterschiedliche Anwendung.

Der kanadische Wissenschaftler Hans Selye führte den Begriff Stress ein und befasste sich mit der biologischen Adaptation an negative Umwelteinflüsse (Selye, 1950, Selye, 1974). Seiner Definition zufolge ist „Stress die unspezifische Reaktion des Körpers auf jede Anforderung, die auf ihn ausgeübt wird“. Distress wird definiert als unangenehmer Stress oder Stress, der für den Körper schädlich ist. Die Stressantwort ist nach Selye der Prozess der Reaktion auf den Stress (Selye, 1974). Selye beschrieb ein einheitliches Muster der Stressantwort auf die unterschiedlichen Stressoren, unabhängig ob diese langfristige pathologische Veränderungen verursachen können. Er konzentrierte sich bei seiner Theorie auf die Hypophysen- Nebennierenrinden- Achse als wichtigster Effektor der Stressreaktion, wobei die Nebennierenrinde das zentrale Organ darstellt (Selye, 1950). Auch Banks beschrieb den Anfang der Stressreaktion mit dem Beginn der Aktivität der Nebennierenrinde (Banks, 1982).

Chrousos und Gold beschrieben Stress als „Zustand der Disharmonie oder der bedrohten Homöostase, was beides spezifische und unspezifische Reaktionen hervorruft“. (Chrousos und Gold, 1992)

McGrath definierte Stress als ein Ungleichgewicht zwischen Anforderungen aus der Umwelt und der Antwortmöglichkeit des Organismus (Mc Grath, 1970).

Hobfoll stellte die Theorie der „Erhaltung von Ressourcen“ auf. Dabei spielt der Verlust einer Ressource die zentrale Rolle bei der Entstehung von Stress. Er unterschied zwischen psychologischem und physischem Stress (Hobfoll, 1989).

Moberg unterschied zwischen positivem und negativem Stress. Er definierte Stress als biologische Antwort auf einen Stressor und beschrieb Stress als eine wirkliche oder vermeintliche Bedrohung der physiologischen Homöostase des Organismus oder des psychologischen Wohlbefindens. Der Stressor ist dabei eine individuell wahrgenommene Bedrohung des physiologischen Gleichgewichts. Distress bezeichnet negativen Stress und liegt dann vor, wenn das Wohlbefinden des Tieres beeinträchtigt wird. Im Gegensatz dazu bedeutet positiver Stress, dass die Stressantwort auf einen Stressor nicht nachteilig auf das Gleichgewicht des Körpers wirkt (Moberg, 2000).

Schon Breazile berücksichtigte in seiner Definition von Stress positive und negative Stressformen (Breazile, 1987). Er teilte Stress in drei unterschiedliche Formen ein. Eustress ist positiver Stress, der nicht schädlich für den Organismus ist und eine Stressantwort induziert, die förderlich für das Wohlbefinden ist. Neutraler Stress hat weder positive noch negative Auswirkungen auf den Organismus. Distress bezeichnet negativen Stress, der das Wohlbefinden eines Organismus pathologisch beeinflusst und somit schädlich für einen Organismus ist.

Wenn Eustress oder neutraler Stress langanhaltend oder intensiv auf einen Organismus wirkt, kann er zu Distress werden.

Sanford und Mitarbeiter zeigten die Begriffe physiologischer Stress, Überstress und Distress auf. Physiologischer Stress basiert auf einer einfachen adaptiven Antwort des Körpers, die unbewusst vom Organismus ausgeführt wird. Überstress findet ebenfalls unbewusst statt, führt aber mit einer Anstrengung des Organismus zu Störungen von homöostatischen Prozessen im Körper. Der Distress ist mit dem Angriff von substantiellen Körperreserven verbunden, was schädliche Nebenwirkungen zur Folge haben kann. Diese dem Organismus bewusste Anstrengung führt zu einem leidenden Zustand (Sanford et al., 1986).

Die FELASA beschrieb Distress als einen negativen, aversiven Zustand, der vergleichbar mit mentalem oder emotionalem Schmerz ist (FELASA, 1994).

Eine neuere Definition von Stress hat Goldstein aufgestellt. Dabei ist „Stress ein Zustand, in dem Erwartungen, die entweder genetisch festgelegt sind, durch Lernen etabliert sind oder sich durch die Umstände ergeben, nicht zu der aktuellen oder erwarteten Wahrnehmung der internen oder externen Umgebung passen und diese Diskrepanz zwischen dem, was beobachtet oder empfunden wird und dem, was erwartet wird kompensatorische Reaktionen hervorruft.“ (Goldstein, 2003)

2.2.2.2 Stressoren

Der Begriff Stressor bezeichnet unangenehme oder bedrohliche Reize, die die Homöostase stören. Es werden unterschiedliche Kategorien von Stressoren beschrieben.

Kälte, Hitze, Strahlung, Lärm, Vibrationen, chemische Stressoren, Schmerz und Immobilisation stellen physische Stressoren dar.

Psychologische Stressoren haben Auswirkungen auf emotionale Prozesse wie Angst und Furcht und können zu Verhaltensänderungen führen.

Soziale Stressoren sind dann vorhanden, wenn die Interaktion zwischen Individuen gestört ist. Dazu zählt z.B. ein gesteigertes Dominanzverhalten eines Individuums gegenüber einem anderen Individuum (Kvetnansky et al., 2009).

2.2.2.3 Biologische Stressachsen

Verschiedene Stressoren lösen bestimmte biologische Prozesse im Organismus aus. Psychosoziale und physischen Stressoren führen zu den Aktivierungsmustern des sympathikoneuralen Systems, der sympatho- adrenomedullären- Achse (SAM- Achse) und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHNA) (Rensing et al., 2006).

Sympathikoneurales System und sympatho- adrenomedulläre- Achse (SAM- Achse)

Das vegetative Nervensystem wird aus dem Sympathikus, dem Parasympathikus und dem enterischen Nervensystem gebildet (Breedlove et al., 2007, Schandry, 2006). Bei einer stressinduzierten Aktivierung des vegetativen Nervensystems kommt es zu einer Aktivierung des Sympathikus und zu einer Veränderung des parasympathischen Tonus (Breazile, 1987). Die Folge dieser Prozesse ist eine sehr schnelle und kurzfristige Erhöhung der Herzfrequenz, des Blutdrucks und der gastrointestinalen Aktivität (Moberg, 2000, Smith und Vale, 2006).

Das sympathikoneurale System wird vom Sympathikus und seinen Ganglien gebildet, die SAM- Achse besteht aus dem sympathischen Nervensystem und dem Nebennierenmark. Durch Stressoren kommt es zur Ausschüttung von Glutamat aus der Amygdala des limbischen Systems und es folgt eine Aktivierung des Locus coeruleus im Metencephalon mit einer Freisetzung von Noradrenalin, welches das sympathische Nervensystem aktiviert. Die Nervenendigungen der Neurone des sympathischen Nervensystems setzen wiederum Noradrenalin frei, was direkt an den inneren Organen über adrenerge Rezeptoren wirkt und die extrem schnelle Erhöhung der Herzfrequenz auslöst (sympathikoneurales System, siehe Abbildung 1) (Kvetnansky et al., 2009). Weiterhin wirkt das aktivierte sympathische System

auf die Nebenniere und bewirkt die Freisetzung von Adrenalin und Noradrenalin aus den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks. Über das Blutgefäßsystem gelangen das freigesetzte Adrenalin und Noradrenalin an die Gewebe und Organe und löst dort seine physiologische Wirkung aus (SAM- Achse, siehe Abbildung 1) (Rensing et al., 2006, Kvetnansky et al., 2009). Die Folge ist eine erhöhte Durchblutung der lebenswichtigen Organe wie Herz, Lunge und Gehirn und eine Vasokonstriktion in der Peripherie. Diese Sympathikus Reaktion wird nach Cannon als Kampf-oder-Flucht-Reaktion (fight or flight) bezeichnet (Cannon, 1932) und gilt als erste Welle der Stressreaktion, da sie innerhalb weniger Sekunden reagiert und nur eine sehr kurze Zeit anhält (Mc Ewen und Sapolsky, 1995, Ulrich-Lai und Herman, 2009).

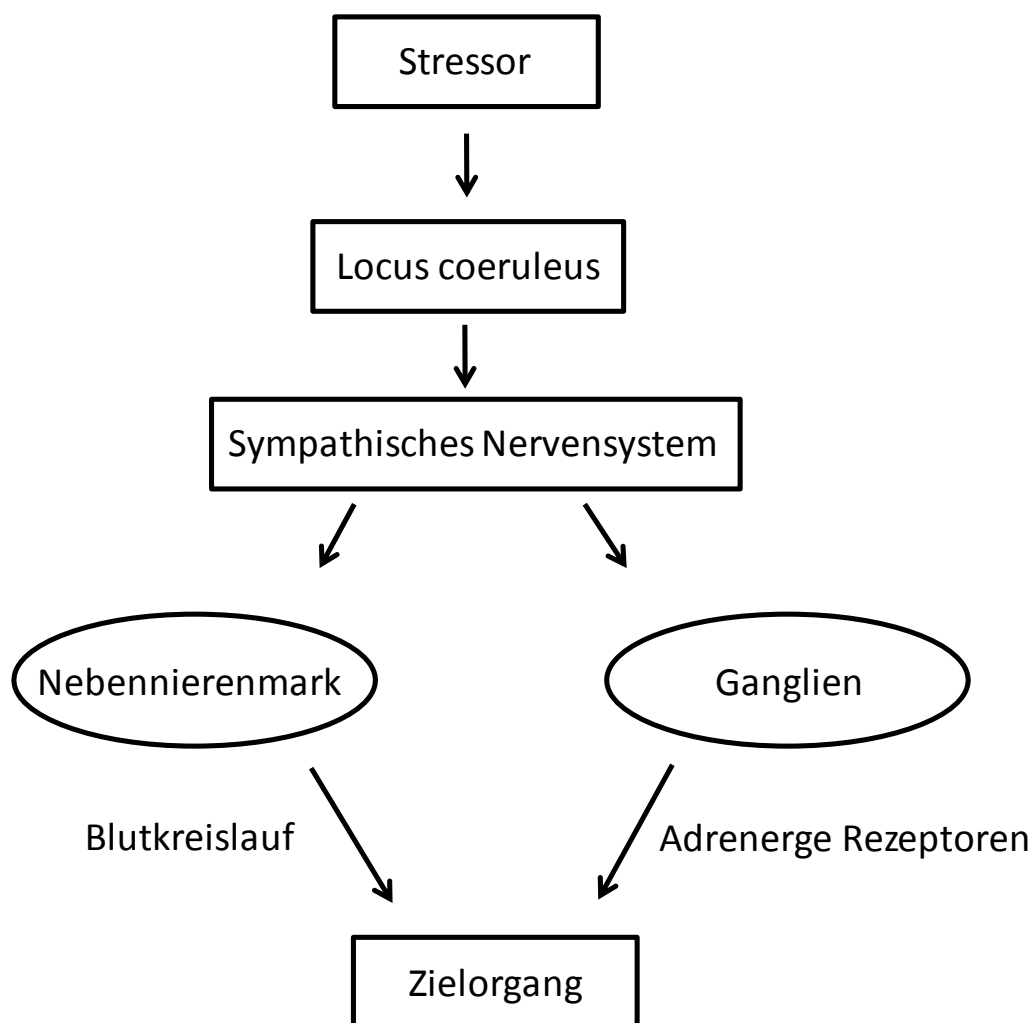


Abbildung 1: Die SAM- Achse und das sympathikoneurale System. Stressoren aktivieren den Locus coeruleus im Metencephalon und damit das sympathische Nervensystem, welches das Nebennierenmark zu Ausschüttung von Adrenalin und Noradrenalin in den Blutkreislauf anregt. Die Nervenendigungen der Neurone des sympathischen Nervensystems setzen Noradrenalin frei. Adrenalin und Noradrenalin wirken auf die Zielorgane mit einer Aktivierung des Kreislaufsystems, sowie einer erhöhten Energieversorgung der Muskeln und der Lungenkapazität (modifiziert nach Rensing et al., 2006)

Hypothalamus- Hypophysen- Nebennierenrinden- Achse (HHNA)

Die HHNA besteht aus dem Hypothalamus, der Hypophyse und der Nebennierenrinde. Der Hypothalamus gehört zum zentralen Nervensystem und besteht aus basalen Teilen des Zwischenhirns (Matteri et al., 2000, Möstl, 2000). Er reguliert den Ausdruck des emotionalen Verhaltens, das Sexualverhalten und viele körperliche Reaktionen wie Blutdruck und Körpertemperatur (Lindsay und Voith, 2000).

Bei akutem psychischem oder physischem Stress kommt es zu einer Aktivierung der HHNA. Abbildung 2 nach Juruena und Mitarbeitern zeigt die Vorgänge bei der Aktivierung auf (Juruena et al., 2004). Durch neurosekretorischen Zellen im Hypothalamus erfolgt zunächst eine vermehrte Sekretion des Corticotropin-Releasing Hormons (CRH) in die Portalvene (Moberg, 2000, Ganong, 1988). Der Hypothalamus ist über den Hypophysenstil mit dem Hypophysenhinterlappen und über das Pfortadersystem mit dem Hypophysenvorderlappen verbunden. Das Hormon CRH wirkt also über die Portalvene am Hypophysenvorderlappen (Ganong, 1988, Lindsay und Voith, 2000, Möstl, 2000). Dort stimuliert es die Freisetzung des glandotropen Hormons Adrenocorticotropin (ACTH) in die Blutlaufbahn. Das freigesetzte ACTH gelangt über das Blut zur Nebenniere und bewirkt die Synthese von Glucocorticoiden insbesondere in der Nebennierenrinde (Axelrod und Reisine, 1984, Matteri et al., 2000). Bei Mäusen und Ratten wird das Glucocorticoid Corticosteron freigesetzt. Über einen negativen Rückkopplungseffekt des Glucocorticoides wird die Ausschüttung von ACTH an der Hypophyse und die Freisetzung von CRH am Hypothalamus kontrolliert, so dass eine überschießende Reaktion verhindert wird (Ganong, 1988, Axelrod und Reisine, 1984, Lindsay und Voith, 2000). Bei akutem Stress beendet dieser Rückkopplungseffekt die Stressreaktion nach Abklingen des Stressors. Bei chronischem Stress ist oft der Effekt gestört und es kommt zu einer Dysregulation der HHNA (Miller et al., 2007).

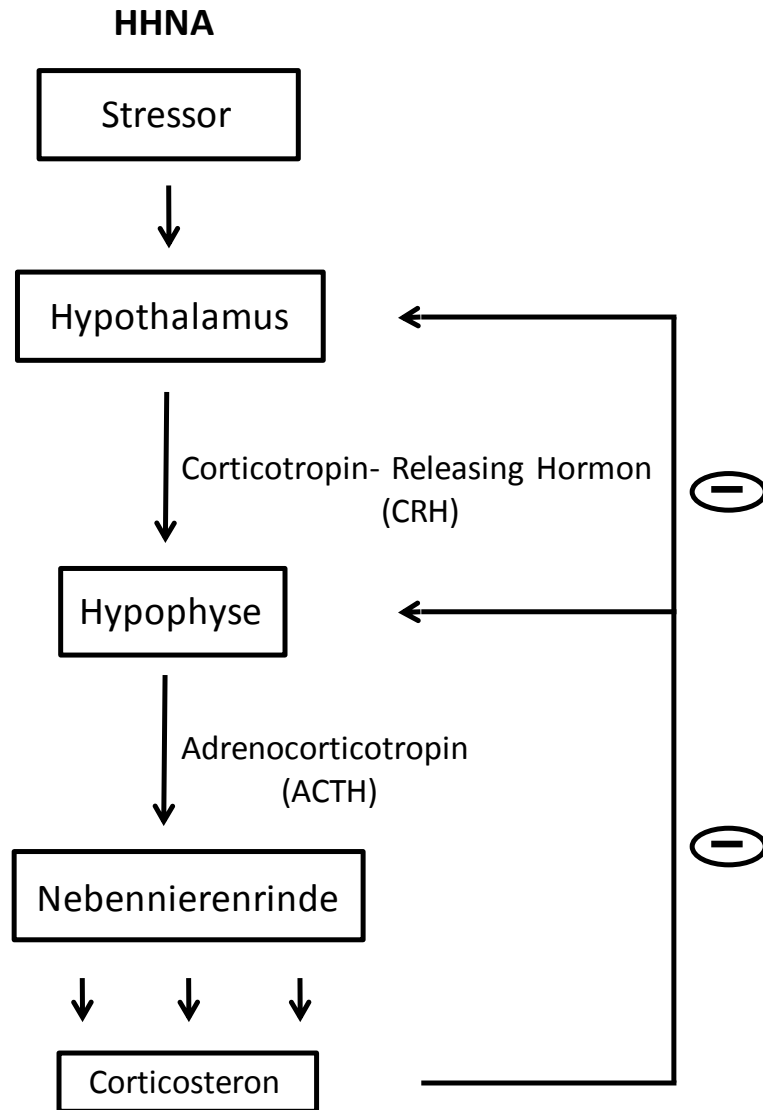


Abbildung 2: Die HHNA.

Stressoren bewirken in den paraventriculären Neuronen des Hypothalamus eine vermehrte Freisetzung von CRH in den Pfortaderkreislauf. CRH gelangt so zur Hypophyse und stimuliert dort die Ausschüttung von ACTH, welches in den Blutkreislauf freigesetzt wird und an der Nebennierenrinde eine erhöhte Glucocorticoidsynthese bewirkt. Corticosteron wird freigesetzt. Über eine negative Rückkopplung verhindert Corticosteron eine überschießende Reaktion (nach Juruena et al., 2004)

Bei der Aktivierung der HHNA wird die maximale Corticosteronkonzentration im Blut nach ca. 15 bis 20 Minuten erreicht und kehrt nach ca. 60 Minuten wieder auf den Basalwert zurück (de Kloet et al., 2005, Benedetti et al., 2012). Im Vergleich zum sympathikoneuralen System und zur SAM- Achse reagiert die HHNA langsamer und stellt die zweite Welle der Stressreaktion dar.

Bei Auftreten eines Stressors reagieren das sympathikoneurale System und die SAM- Achse innerhalb weniger Sekunden und somit deutlich schneller als die HHNA mit ihrer komplexen neuroendokrinen Kaskade (Gunnar und Quevedo, 2007). Durch diese extrem schnelle, aber

auch nur sehr kurz anhaltende Reaktion des sympathikoneuralen Systems und der SAM-Achse stellt sich die Messung der durch die SAM-Achse gebildeten Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin in der vorliegenden Arbeit als schwierig dar, da das Handling für die Blutentnahme bereits die Konzentrationen der Katecholamine im Blut so verändern würde, dass eine Überlagerung zwischen der Erhöhung der Konzentrationen durch die Belastung der Applikationsmethoden und durch die Belastung der Blutentnahme zustande käme.

Abbildung 3 zeigt zusammenfassend die wichtigsten Elemente der SAM-Achse, des sympathikoneuralen Systems und der HHNA auf.

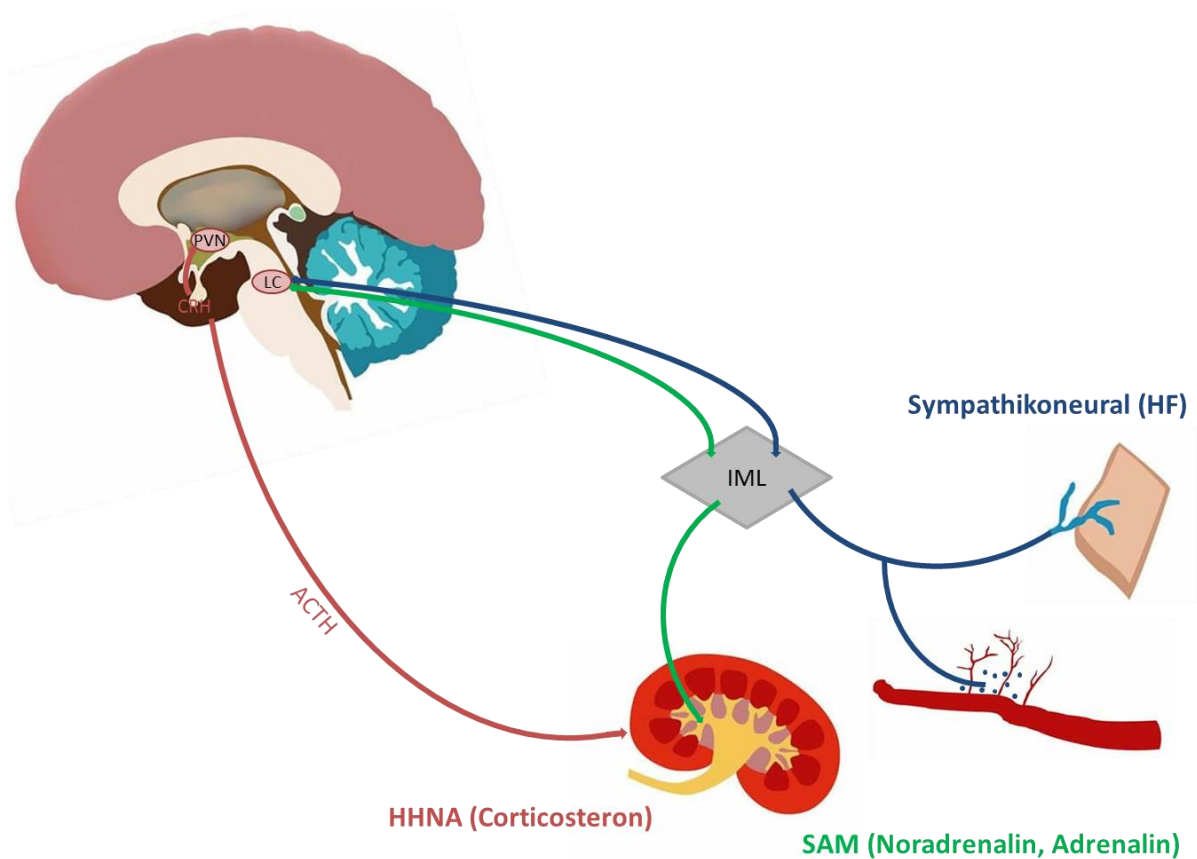


Abbildung 3: Elemente der SAM-Achse, des sympathikoneuralen Systems und der HHNA.
Nach Kvetnansky et al., 2009.

In dieser Arbeit findet ausschließlich die Messung des bei der Maus ausgeschütteten Corticosterons (HHNA) und der durch die Telemetrie erfassten Herzfrequenz (sympathikoneurales System) statt.

2.2.3 Techniken der Belastungseinschätzung beim Versuchstier

Die Beurteilung von Stress und Schmerz stellt einen sehr wichtigen Aspekt bei Tierexperimenten dar und wird in zahlreichen Publikationen behandelt. Schmerz ist aus ethischen und

tierschutzrechtlichen Gründen in Tierexperimenten zu minimieren. Schmerz, der durch einen Tierversuch ausgelöst wird, kann die Versuchsergebnisse verändern, da er eine emotionale und physische Belastung für das Tier bedeutet (Henke et al., 2008, Flecknell, 2009). Richtlinien für die Beurteilung von Schmerz und Unwohlsein wurden bereits 1985 von Morton und Griffiths aufgestellt (Morton und Griffiths, 1985). Eine Methode zur direkten Beurteilung von Schmerz und Distress bei Tieren gibt es bis dato nicht (Murrell und Johnson, 2006).

Beim Tier ist die Beurteilung von Schmerz und Stress schwierig und wird häufig an Beobachtungen wie dem äußeren Erscheinungsbild, der Körperhaltung, dem Verhalten, dem Ernährungszustand, den Lautäußerungen und klinischen Symptomen festgemacht. Diese Parameter setzen eine sehr genaue Kenntnis der Beobachter voraus und dennoch bleibt das Risiko von Artefakten bestehen. Alleine die Anwesenheit von Beobachtern kann physiologische Parameter und Verhaltensweisen verändern. Ebenso stellt die Subjektivität des Beobachters ein Problem dar (Stasiak et al., 2003).

■ Klinische Untersuchung

Eine verminderte Wasser- und Futteraufnahme kann ein wichtiges Zeichen für einen verschlechterten Gesundheitszustand durch Schmerz und Stress sein und geht mit einem Verlust von Körpergewicht einher (Olfert, 1995). Zur objektiven Beurteilung des Ernährungszustands bei Nagetieren wird neben der Messung des Körpergewichts auch eine Messmethode herangezogen, bei der die Menge an von außen sichtbarem Gewebe über Knochenvorsprüngen am dorsalen Becken bei jedem Individuum betrachtet wird. Dieser Body Condition Score (BC) variiert zwischen 1 (Abmagerung) und 5 (Adipositas) (Ullman-Cullere und Foltz, 1999, Foltz und Ullman-Cullere, 1999, Hickman und Swan, 2010).

■ Schmerzgesicht

Langford und Mitarbeiter entwickelten ein Kodierungssystem für das sogenannte „Schmerzgesicht“. Danach werden Veränderungen im Gesichtsausdruck analog zu humanen Kodierungssystemen bei Kindern kodiert. Basierend auf diesen Veränderungen wurde eine Skala erstellt (mouse grimace scale, MGS), anhand derer ein Einblick in das subjektive Schmerzempfinden von Mäusen gegeben wird und eine Bewertung der Schmerzintensität möglich ist (Langford et al., 2010).

In einer Studie von Leach et al. zur Schmerzbewertung bei Mäusen nach Vasektomie wird die MGS als ein schnelles und einfaches Mittel zur Bewertung von postoperativem Schmerz beschrieben (Leach et al., 2012).

■ Beeinträchtigt Verhalten

Das Wühlverhalten ist ein spontanes und hoch motiviertes Verhalten bei Mäusen. Es wurde in einer Studie von Jirkof und Mitarbeiter als Indikator für Schmerz nach einer Laparotomie untersucht. Hier zeigte sich, dass eine Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes aufgrund von Schmerzen nach einer Operation auf der Grundlage des zeitlich verzögerten Wühlverhaltens beurteilt werden kann (Jirkof et al., 2010). Ebenso kann eine Minimierung und Veränderung des Nestbauverhaltens eine Aussage über Schmerz und Stress möglich machen (Jirkof, 2014, Gaskill et al., 2013). Natürlich kann auch die Gesamtaktivität zur Belastungsbewertung herangezogen werden.

■ Stresshormone

Der Anstieg von Glucocorticoiden, Katecholaminen oder anderer Hormone im Plasma kann eine erhöhte Stress- oder Schmerzempfindung bedeuten (ILAR, 1992).

Die Schwierigkeit der Messung dieser Hormone besteht darin, dass die Probenentnahme per se schon eine Aktivierung der HHNA und SAM- Achse mit einem Anstieg der Hormonkonzentration induzieren kann. Die Blutentnahme muss also sehr schnell oder über einen implantierten Katheter erfolgen, der bei der Ratte bereits etabliert ist (Vahl et al., 2005, de Jong et al., 2001). In der Literatur variieren die Werte für die basale Katecholaminkonzentration bei Mäusen zwischen 4- 140 nM, abhängig von der Art der Blutprobenentnahme (Grouzmann et al., 2003), was die Schwere aufzeigt reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse bei der Messung des katecholaminergen Systems zu erhalten.

Eine weitere Möglichkeit für die Messung von Glucocorticoiden ist die Messung in Urin oder Kot der Tiere (Touma et al., 2004, Palme, 2005). Dabei ist aber die tageszeitlich bedingte, natürliche Schwankung der Ausscheidung von Glucocorticoiden als Störfaktor anzusehen (Pihl und Hau, 2003, Touma et al., 2003). Außerdem kann die Corticosteronkonzentration so an keinem einzelnen Zeitpunkt dargestellt, sondern rein der zirkulierende Corticosteronspiegel über einen Zeitraum ermittelt werden (Palme et al., 2005).

■ Herzfrequenz

Die Aktivierung der SAM- Achse durch stressauslösende Reize bewirkt einen unmittelbaren Anstieg von Herzfrequenz und Körpertemperatur und ist neben der HHNA das zweite wichtige System, dass eine Stressantwort induziert (Harkin et al., 2002, van den Buuse et al., 2001). Die Messung der Aktivität der SAM- Achse in einer Belastungssituation erfolgt über die Bestimmung der Herzfrequenz.

Bei Nutztieren zeigen Studien, dass belastende Situationen zu einer Herzfrequenzerhöhung führen (Loijens et al., 2002, Van Reenen et al., 2002).

Bei Ratten wird der Herzfrequenzanstieg in Schmerzstudien als Beurteilungskriterium für die Wirksamkeit von pharmakologischen Substanzen herangezogen, und auch bei anderen Stressstudien bei der Ratte ist die Herzfrequenz der aussagekräftige Parameter (Nijsen et al., 2003, Harkin et al., 2002, van den Buuse et al., 2001).

Bei Labormäusen sind Herzfrequenzanstiege über einen längeren Zeitraum nach Operationen beschrieben (Butz und Davisson, 2001, Arras et al., 2007a, Hawkins, 2002) und auch in anderen Studien wurde auf der Basis der Herzfrequenz Veränderung belastende Situationen beurteilt (Meijer et al., 2007, Spani et al., 2003, Rettich et al., 2006, Cinelli et al., 2007, Arras et al., 2007b).

Telemetrische Messungen liefern zuverlässig Herzfrequenzdaten, so dass anhand telemetrischer Studien Aussagen über Schmerz und Stress beim Labortier gemacht werden können (Butz und Davisson, 2001, Arras et al., 2007a, Arras et al., 2007b, Ilback et al., 2008).

Zusammenfassend ist in Tabelle 1 eine Übersicht nach Kretlow und Mitarbeitern über die Methoden, die aktuell zur Belastungserfassung bei Versuchstieren eingesetzt werden, aufgezeigt (Kretlow et al., 2010).

Tabelle 1: Aktuelle Belastungserfassungsmethoden bei Versuchstieren und ihre Bewertung.

	Vokalisation	Gen-expression	Allgemeines Verhalten und Habitus	Telemetrie	Stress-hormone
Schnelligkeit	schnell	schnell	schnell	langsam	schnell
Objektivität	objektiv	sehr objektiv	weniger objektiv	sehr objektiv	sehr objektiv
Zuverlässigkeit	fraglich	fraglich	fraglich	sehr zuverlässig	sehr zuverlässig
Quantifizierbarkeit	ja?	ja?	ja?	ja	ja
Invasivität	nein	nein	nein	ja	ja/ nein
Tiermanipulation	ja?	nein	nein	nein	ja/ nein
Probleme	Interpretation	zu früh	Interpretation	teuer (Transmitter und Anlage)	teuer (Kits)
Einzelhaltung	ja	nein	ja/nein	ja/nein	nein

Modifiziert nach Kretlow et al., 2010

Eine Methode zur Belastungsbeurteilung ist immer dann objektiv, wenn sie bestimmte Kriterien erfüllt. Die Zuverlässigkeit ist dann gegeben, wenn die Belastung des Tieres sicher einen Einfluss auf Messparameter hat. Die Quantifizierbarkeit beschreibt die Zuordnung zwischen den erhaltenen Messergebnissen und der Belastungsstufe. Kann der Experimentator die Belastung objektiv bewerten, so spricht man von Beobachtungsgleichheit oder Objektivität. Anhand der Tabelle 1 wird deutlich, dass telemetrische Messungen objektiv verlässliche Daten über Belastungsparameter wie Kreislauf und Aktivität (Arras et al., 2007a) liefern, ohne dass am Tier zum Zeitpunkt der Datenerhebung manipuliert werden muss.

2.3 Telemetrie

Telemetrie ist „Fernübertragung von Messgrößen“ (Pschyrembel, 2007). Das Wort Telemetrie hat altgriechische Wurzeln. Tele steht für „fern“ und metron für „messen“. Es werden dabei Messwerte von einem Sensor zu einer Überwachungseinheit übertragen und dort gespeichert oder weiter verarbeitet.

Biotelemetrie ist die Anwendung der Telemetrie auf Größen, die für die Untersuchung biologischer Vorgänge von Interesse sind (Hutten, 1973).

Telemetrie ist das State of the art Verfahren für die Messung und Beurteilung von Herzfrequenz und Aktivität in Säugetieren.

2.3.1 Entwicklung der Telemetrie

Kimmich beschreibt die frühe Entwicklung der ersten Generation der Telemetrie (Kimmich, 1980). Danach gelang das erste telemetrische Experiment mit einer erfolgreichen Übertragung von biologischen Informationen von einem lebenden Tier dem Franzosen Maurey bereits 1869. 1903 konnte Einthoven ein EKG über eine Distanz von 1,5 km aufnehmen und übertragen, wobei er die Leitungen des öffentlichen Telefonsystems verwendete. 1910 entwarf Baker ein System, um EKGs in mehreren Stationen eines Krankenhauses überwachen zu können. Gleichzeitig machte Brown ein Telemetrieexperiment, in dem er Herzgeräusche über 150 km mittels Telefonkabel übertrug. 1921 bediente sich Winters bereits der kabellosen Telemetrie. Er übertrug Herztöne über vorhandene Funkgeräte eines Schiffes. 1948 wurde von Fuller und Gordon ein tragbares System entwickelt, mit dem ihnen radiotelemetrische Messungen bei Tieren gelang. 1949 konnte dieses System von Holter und Gengerelli auf den Menschen übertragen werden. Diese telemetrischen Systeme wurden an Tier oder Mensch von außen befestigt und waren mit ca. 50% des Körpergewichts so schwer, dass sie für Ruhestudien ungeeignet waren, da das Tragen des Systems bereits Anstrengung bedeutete. Aber sie zeigten dennoch, dass das Übertragen von biologischen Signalen von einem

sich bewegenden Individuum möglich war. Mit der Erfindung des Transistors im Jahre 1948 und dessen Verfügbarkeit für die Öffentlichkeit seit dem Jahre 1952 schritt die Entwicklung der Telemetrie voran. Es entstanden Telemetriesysteme, die leichter und von der Größe angepasster waren (Kimmich, 1980).

Diese Telemetriesysteme nutzte erstmals Baar 1954 für EKG und Atemfrequenzmessungen beim Menschen. 1957 führten die Wissenschaftler Frankel und Mitarbeiter und Gold und Malcom telemetrische Messungen in Versuchen mit Affen und Katzen durch. Russland schickte im November desselben Jahres die Hündin Laika in einem telemetrisch verkabelten Korsett ins All, um die Veränderung der physiologischen Parameter zu messen (Kramer et al., 2001). 1963 wurde die Telemetrie auch bei Wildtieren eingesetzt als William W. Cochran eine Senderschaltung entwickelte, die hochfrequente Radiosignale sendete (Cochran und Lord, 1963). 1965 wurde von Deboo und Fryer eine der ersten implantierbaren Telemetriesysteme für kardiovaskuläre Messungen beschrieben und 1986 waren die ersten kommerziell implantierbaren Geräte zur Messung physiologischer Parameter bei kleinen Labortieren erhältlich (Kramer et al., 2001). 1972 führten Carson und Mitarbeiter die ersten telemetrischen EKG Messungen an Mäusen durch (Carson et al., 1972). Die erste Untersuchung an der Maus mittels implantierbarer Telemetrie wurde 1989 von Clement durchgeführt (Clement et al., 1989). Bis heute entwickeln Forschergruppen unabhängig voneinander radiotelemetrische Systeme für große und kleine Labortiere, die kommerziell erhältlich sind und deren Bedeutung für die Forschung ständig wächst (Kramer et al., 2001).

2.3.2 Telemetrie in der Maus

Radiotelemetrie ist die einzige Technik, die es ermöglicht physiologische Daten von Mäusen zu sammeln, die sich frei bewegen können. Daten können dabei über einen längeren Zeitraum in der den Tieren vertrauten Umgebung kontinuierlich gesammelt werden, wodurch Artefakte durch eine fremde Umgebung vermieden werden (Kramer et al., 2001, Cesarovic et al., 2011). Zudem kann die Anwesenheit von Menschen die Versuchsergebnisse verändern. Bei telemetrischen Messungen ist diese Anwesenheit nicht mehr nötig und auch das Handling als ein Stressfaktor wird auf ein Mindestmaß reduziert, da eine Fixierung zur Datenaufzeichnung entfällt. In einer Studie von Cinelli und Mitarbeitern (Cinelli et al., 2007) wird deutlich, dass alleine das Handling und die Fixierung von Mäusen eine Stressreaktion induziert. Dabei wurden mittels telemetrischer Messungen Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität von Tieren verglichen, die entweder nur fixiert wurden oder bei denen zusätzlich eine Biopsie gewonnen wurde. Die Fixierung alleine und die Fixierung mit Probenentnahmen ergaben dabei ähnliche physiologische Reaktionen. Meijer und Mitarbeiter bestätigten ebenfalls durch telemetrische Messungen, dass das Handling und die Fixierung einen signifikan-

ten Anstieg von Herzfrequenz und Körpertemperatur im Sinne einer Stressantwort induzieren (Meijer et al., 2007).

Telemetrische Messungen erlauben eine Aussage anhand des Anstiegs von Herzfrequenz, Herzfrequenzvariabilität und Körpertemperatur über das Ausmaß an Schmerzen oder Leiden (Arras et al., 2007a).

Auch in Hinsicht auf das 3R Prinzip leistet die Telemetrie einen wichtigen Beitrag. Die Telemetrie minimiert Störungen und Artefakte in den Messungen und erhöht die Datenanzahl, die pro verwendetes Tier gewonnen werden kann. Somit werden Wiederholungen oder neue Studien mit weiteren Tieren für die gleiche Fragestellung auf ein Minimum reduziert. Je nach Versuchsaufbau können Tiere in mehreren Studien nochmals verwendet werden.

Zusammenfassend ermöglicht die Telemetrie Untersuchungen an sich frei bewegenden Tieren in der ihnen vertrauten Umgebung mit minimaler Beeinflussung durch den Menschen, was erheblich zur Steigerung der Qualität der erhobenen Daten und des Wohlbefindens der Versuchstiere beiträgt (Kramer und Kinter, 2003).

Die Telemetrie bei der Maus bietet die Möglichkeit Routineprozeduren objektiv und zuverlässig zu messen und zu beurteilen. So können alltägliche versuchstierkundliche Handlungen verbessert werden und die Belastung für Versuchstiere minimiert werden. Balcombe und Mitarbeiter fassen in einem Paper 80 Studien zusammen, die sich mit der potentiellen Stressbelastung von Nagetieren durch Routineeingriffe befassten. Dabei wurden die Eingriffe in der Inaktivitätsphase (Helligkeitsperiode) der Tiere durchgeführt. Dazu zählten die Blutentnahme, die Schlundsondierung und das Handling. Die Tiere reagierten auf alle genannten Routineprozesse mit einer starken, schnellen und signifikanten Stressantwort (Balcombe et al., 2004).

In der hier vorliegenden Arbeit soll die telemetrische Erfassung der Parameter Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität dazu genutzt werden, um die Belastung bei Labormäusen durch unterschiedliche Applikationsmethoden zu erfassen und einzuschätzen.

2.4 Injektionsmethoden bei der Maus

2.4.1 Allgemeines zur Substanzapplikation und Definition

Applikationen von Substanzen sind in den meisten Versuchsanordnungen unerlässlich. Die Applikationstechniken können eine Auswirkung auf das Wohlbefinden des Tieres und den wissenschaftlichen Wert der Ergebnisse haben. Durch die Substanzen, die auf unterschiedlichen Wegen für verschiedene Zwecke injiziert werden, kann es zu Belastungen der Ver-

suchstiere kommen (Morton et al., 2001). Neben dem Applikationsweg müssen auch Faktoren wie Absorption, Verteilung, Stoffwechsel und Ausscheidung von therapeutischen oder chemischen Mitteln beachtet werden. Ebenso das Volumen und die Häufigkeit der Verabreichung, die Kanülenstärke, die Dauer der Behandlung, der pH- Wert, die Stabilität, Homogenität und Osmolalität der zu verabreichenden Substanz und auch die Fixierung des Tieres bei den unterschiedlichen Injektionstechniken (Turner et al., 2011).

Ziel unserer Untersuchungen war es, die Belastung durch Injektionstechniken bzw. durch die Schlundsondierung telemetrisch zu erfassen. Bis dato gibt es darüber kaum objektive Aussagen. Um den physikalischen Stress durch den sicherlich vorhandenen Injektionsschmerz vom psychologischen Stress der Fixierung unterscheiden zu können, wurden Kontrolltiere lediglich fixiert bzw. anästhesiert und Versuchstiere zusätzlich injiziert.

Die Injektion (lat. iniacere: „hineinwerfen“) ist das Einbringen von gelösten oder suspendierten Substanzen in den Organismus in kleinen Volumina. Bei der Applikation mittels Injektion wird der Verdauungstrakt umgangen, man spricht von der parenteralen Eingabe einer Substanz im Gegensatz zu der enteralen Applikation, bei der die Substanz über den Verdauungstrakt dem Körper hinzugefügt wird. Parenterale Verabreichungsverfahren erzeugen typischerweise die höchste Bioverfügbarkeit von Substanzen, da eine teilweise oder komplette Metabolisierung der Substanz in der Leber vor Erreichen des Zielorgans (First-Pass Effekt) umgangen wird. Im Gegensatz dazu kann dieser Effekt bei oral verabreichten Chemikalien und Therapeutika nicht vermieden werden (Turner et al., 2011).

Es ist anzunehmen, dass manche Applikationswege und Applikationstechniken für das Tier schmerzhafter und mit mehr Stress verbunden sind als andere. Tierschutzrechtlich sollte immer die Technik gewählt werden, die mit den Versuchszwecken kompatibel ist und die für das Tier am wenigsten Unwohlsein herbeiführt (Morton et al., 2001). Eine Beurteilung der Belastung der Tiere durch unterschiedliche Techniken ist für diese Auswahl sinnvoll. Momentan stehen kaum objektive Daten zu diesem Thema zur Verfügung.

Es können folgende Applikationswege unterschieden werden:

Parenterale Applikation:

- intrakutane Injektion
- subkutane Injektion
- intraperitoneale Injektion
- intravenöse Injektion
- intraplantare Injektion
- intramuskuläre Injektion

Enterale Applikation:

- orale Verabreichung über Futter oder Trinkwasser
- Schlundsondierung

2.4.2 Getestete Applikationen

In der vorliegenden Arbeit soll auf die Injektionstechniken (subkutan, intravenös, intraplantar, intraperitoneal) und die Schlundsondierung eingegangen werden, die bei der Maus in der Praxis angewendet werden. Um Substanzen zu therapeutischen oder experimentellen Zwecken in den Organismus eines Tieres zu applizieren gibt es unterschiedliche Injektionsmethoden. Es muss dabei der Applikationsweg, das maximal zu injizierende Volumen und die maximale Kanülenstärke unbedingt beachtet werden. Prinzipiell sollte immer die Kanüle mit dem kleinsten Durchmesser verwendet werden, die für die Viskosität der einzugebenden Substanz, für das zu verabreichende Volumen und für die Geschwindigkeit der Injektion nötig ist (Quesenberry und Carpenter, 2004).

In der Literatur findet man unterschiedliche Angaben zum maximalen Volumen und der Kanülengröße bei den unterschiedlichen Injektionswegen. Die in Tabelle 2 beschriebenen maximalen Volumina und Kanülengrößen für die subkutane, intraperitoneale und intravenöse Injektion sind eine Empfehlung vom Ausschuss für Tierschutzbeauftragte der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) und dem Arbeitskreis 4 der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz (TVT) (GV-SOLAS et al., 2010). Das maximale Injektionsvolumen und die maximale Kanülengröße in Tabelle 2 sind für die intraplantare (Morton et al., 2001) und retrobulbäre Injektion (Yardeni et al., 2011) bzw. für die Schlundsondierung (Weiss et al., 2014) aus der Literatur übernommen.

Tabelle 2: Empfohlene maximale Injektionsvolumina bei Versuchstieren.

	subkutan	intra- peritoneal	intravenös	intraplantar	retrobulbär	Schlund- sondierung
Injektions- menge	10 ml/ kg KGW	5 ml/ kg KGW	5 ml/ kg KGW	0,05 ml/ Maus	max. 0,15 ml/ 30 g Maus	max. 1 ml/ Maus
Kanülengröße	25- 27 G	25- 27 G	26- 28 G	27 G	max. 27 G	max. 1 mm

Nach GV- SOLAS, 2010, Yardeni et al., 2011, Morton et al, 2001 und Weiss et al., 2014

2.4.2.1 Subkutane Injektion

Bei der subkutanen Injektion wird die Substanz in die Subkutis verabreicht. Makromoleküle der Substanz werden in der Subkutis von kleinen kapillären Blutgefäßen, die unterhalb der Haut liegen, über einen längeren Zeitraum aufgenommen mit minimaler lymphatischer Absorption (Kagan et al., 2007).

Die Haut sollte so locker wie möglich sein an der Stelle, die für die Injektion gewählt wird. In der Regel wird bei der Maus dafür die interskapuläre Gegend oder die Kniefalte genutzt, da Hautfalten dort leicht anzuheben sind. Auch die Inguinalgegend kann mit einem geringeren Injektionsvolumen genutzt werden. Die Nadel sollte in einem flachen Winkel zum Tierkörper eingestochen werden, um Schäden an dem darunter liegendes Gewebe zu minimieren (Turner et al., 2011).

Es konnte gezeigt werden, dass diese Technik schmerzhaft ist, wenn der pH Wert oder die Osmolarität der eingegebenen Substanz suboptimal sind. Gewebenekrosen konnten nachgewiesen werden (Morton et al., 2001).

Es ist darauf zu achten, dass das Injektionsvolumen nicht zu groß ist, da es eine Überhydratation des Tieres und eine für das Tier unangenehme Überdehnung der Haut zur Folge haben kann. Für die dünne Haut der Maus werden 20- 26 G Kanülen verwendet. Es sollten nicht mehr als zwei bis drei Injektionen auf jeder Körperseite am selben Tag durchgeführt werden (Fox et al., 2007).

2.4.2.2 Intraperitoneale Injektion

Die intraperitoneale Injektion wird häufig bei kleinen Versuchstierarten angewandt. Sie wird genutzt, um ein relativ großes Volumen einer Substanz in ein Tier zu verabreichen (Morton et al., 2001). Für die Maus findet man Angaben von 20- 80 ml/kg KGW (Diehl et al., 2001), die GV-SOLAS empfiehlt ein maximales Injektionsvolumen von 10 ml/kg KGW (GV-SOLAS et al., 2010). Die Absorption der Substanz ist langsamer als bei der intravenösen Injektion. Die intraperitoneale Injektion gehört zwar zu den parenteralen Applikationswegen, die Pharmakokinetik der so verabreichten Substanzen ist allerdings eher der oralen Gabe ähnlich, da die Absorption der Substanz in den Mesenterialgefäßen beginnt. Anschließend durchläuft die Substanz die Leber und Pfortadergefäße (Lukas et al., 1971). Somit können intraperitoneal verabreichte Substanzen bereits im Leberstoffwechsel metabolisiert werden, bevor sie den systemischen Kreislauf erreichen. Außerdem kann ein geringer Anteil direkt durch das Diaphragma über kleine Durchtrittsstellen in die thorakale Lymphe gelangen (Abu-Hijleh et al., 1995).

Für die intraperitoneale Injektion wird die Maus fixiert und in die Trendelenburg Position gebracht, so dass das Tier auf dem Rücken liegt, der Kopf nach unten zeigt und die Hinterläufe die höchste Position haben, damit die inneren Organe von der Oberfläche des ventralen Abdomens nach dorsal rutschen. Die Einstichstelle sollte sich im kaudalen Drittel auf der rechten Seite des Tieres nahe der Medianen befinden, um eine Injektion in die Blase oder den Blinddarm zu vermeiden. Der Einstich der Nadel sollte im 10- 30 Grad Winkel erfolgen und nicht zu tief sein, damit die in der Bauchhöhle liegenden Organe nicht verletzt werden (Fox et al., 2007, Coria-Avila et al., 2007). Eine Studie von Miner und Mitarbeitern hat gezeigt, dass bei der intraperitonealen Injektion die Substanz in manchen Fällen nicht in die Bauchhöhle eingebracht wurde, sondern entweder in den Magen, das Lumen des Dünndarmes, in ein Uterushorn oder in die Subkutis appliziert wurden (Miner et al., 1969). Dieses Risiko kann durch Aspiration vor Eingabe der Substanz vermindert werden. Die Gefahr eines schmerzhaften Ileus sowie von Peritonitiden, Verwachsungen oder Fremdkörpergranulomen ist gegeben, wenn wiederholt mit leicht reizenden Vehikeln in die Bauchhöhle appliziert wird (GV-SOLAS et al., 2010, Gotloib et al., 2005).

2.4.2.3 Intravenöse Injektion

Die intravenöse Injektion stellt durch die Applikation direkt in die Blutgefäße eine effektive Eingabe von Substanzen dar. Es wird eine maximale Plasmaexposition in kurzer Zeit erreicht und es kommt zu keiner präenterohepatischen Metabolisierung (Morton et al., 2001). Die Injektion erfolgt bei der Maus am häufigsten in eine der beiden lateralen Schwanzvenen. Abbildung 4 zeigt im Querschnitt die unterschiedlichen Strukturen eines Nagetierschwanzes.

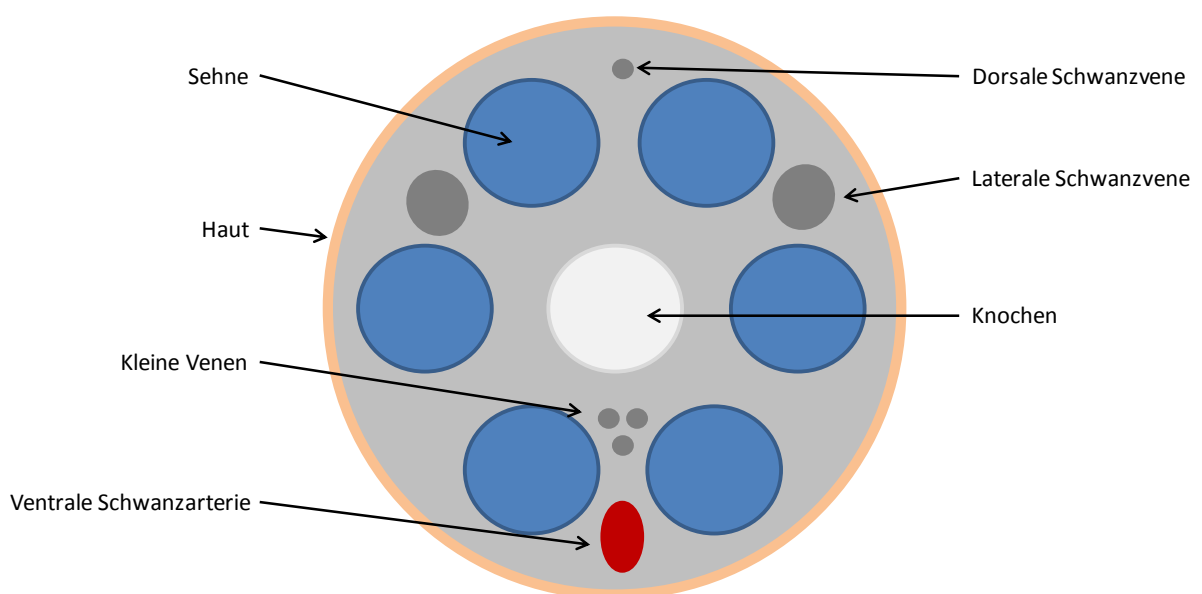


Abbildung 4: Querschnitt durch einen Rattenschwanz.
Modifizierte Zeichnung nach Vanhoutte et al., 2002

Um die Schwanzvene besser zugänglich zu machen, wird der Schwanz mit einer Wärmelampe erwärmt, in warmes Wasser (40- 45°C) getaucht oder mit einem vorgewärmten Handtuch umwickelt (Fox et al., 2007). Dadurch hyperämisiert und dilatiert die laterale Schwanzvene (siehe Abbildung 5).

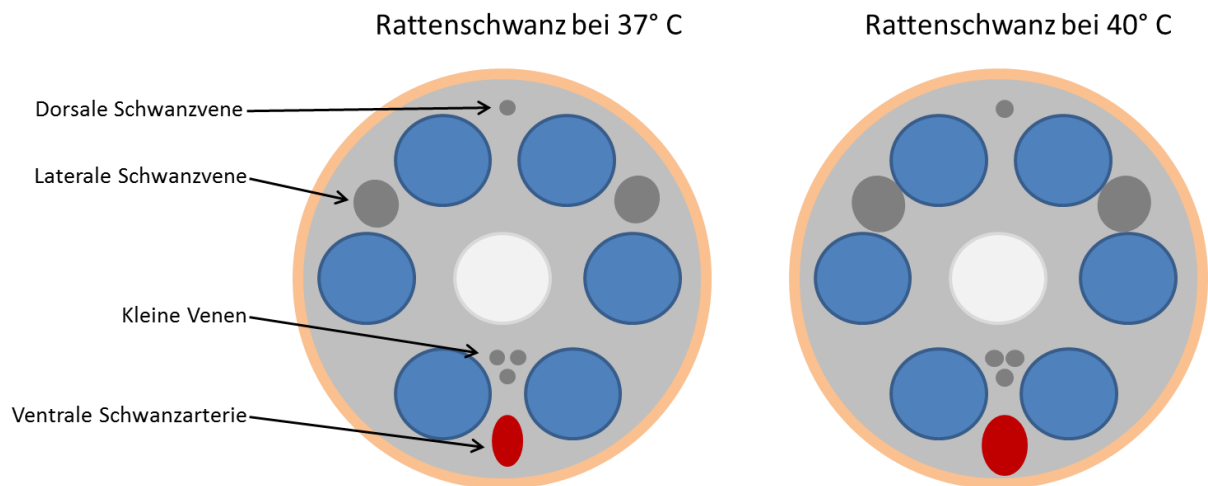


Abbildung 5: Querschnitt durch einen Rattenschwanz bei zwei unterschiedlichen Körpertemperaturen (37° und 40° C).
Bei 40° C ist der Durchschnitt der Blutgefäße, besonders der Venen, größer als bei 37° C. Dieser größere Durchmesser ermöglicht einen höheren Blutfluss durch die Schwanzvene. Modifizierte Zeichnung nach Vanhoutte et al., 2002

Technisch wird eine 26 G Nadel 2- 4 mm tief in das Lumen der Vene vorgeschoben und die Substanz injiziert (Fox et al., 2007). Je nach Geschwindigkeit und Dauer der Injektion unterscheidet man zwischen einer Bolusinjektion, einer langsamen intravenösen Injektion oder einer Infusion.

Bei der Bolusinjektion wird die Substanz innerhalb von einer Minute verabreicht. Sie sollte dabei die Applikationsmenge von 3 ml/min nicht übersteigen. Das erfordert, dass die Substanz nicht zu viskös ist (Diehl et al., 2001).

Eine zu hohe Viskosität oder zu geringe Löslichkeit kann eine langsame intravenöse Injektion erforderlich machen, die fünf bis zehn Minuten dauert.

Bei der intravenösen Injektion ist das Risiko der paravenösen Injektionen gegeben, was zu schmerzhaften Venenentzündungen und Gefäßverschluss führen kann. Die Injektion von Luft kann zu tödlichen Embolien führen.

Das Applizieren von Substanzen über die A. carotis, A. femoralis, V. jugularis oder den retrobulbären Sinus verlangt eine vorhergehende Anästhesie (Fox et al., 2007).

2.4.2.4 Retrobulbäre Injektion

Die Technik der retrobulbären Injektion stellt bei der Maus eine Alternative zur Injektion in die Schwanzvene dar. Die GV- SOLAS weist in ihrer „Stellungnahme aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte zur Applikation in den retrobulbären Venenplexus bei Mäusen“ darauf hin, dass diese Methode der intravenösen Injektion keine Standardmethode der parenteralen Applikation darstellt und grundsätzlich nicht empfohlen wird, da vermutet wird, dass wie bei der Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus Traumata gesetzt werden können (GV-SOLAS, 2012). Außerdem ist die strenge intravenöse Applikation nicht gesichert und deshalb das eingebrachte Volumen unsicher, was zu Gewebsreizungen oder Exophthalmus führen kann. Yardeni und Mitarbeiter verwenden die retrobulbäre Injektion als intravenöse Routineapplikationsform bei der adulten Maus für ein Volumen bis zu 150 µl und beschreiben diesen Applikationsweg im Vergleich zu anderen intravaskulären Injektionen als humaner (Yardeni et al., 2011).

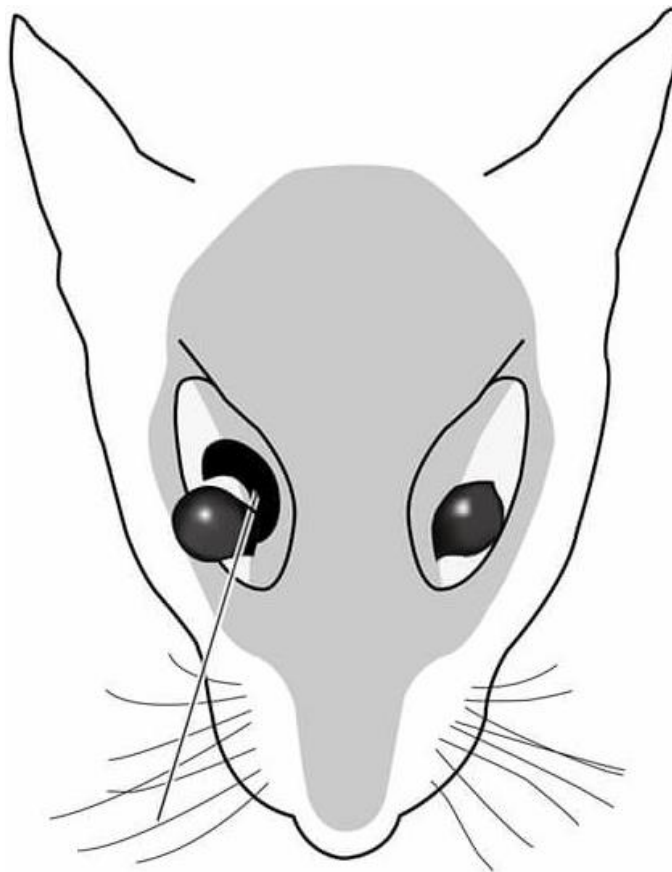


Abbildung 6: Position der Kanüle im retroorbitalen Sinus bei der retrobulbären Injektion.
Modifiziert nach Yardeni et al., 2011

Für die retrobulbäre Injektion wird eine Kanüle mit einer Größe von 27,5 G verwendet. Da die Kanüle in den Bereich direkt hinter dem Augapfel eingeführt werden muss (siehe Abbildung 6), wird die Maus kurzzeitig in eine Vollnarkose versetzt (Inhalationskurznarkose mit Isoflu-

ran). Zur Durchführung der Injektion wird der Augapfel vorsichtig ein wenig aus der Augenhöhle gedrückt, indem leichter Druck auf die Haut dorsal und ventral des Auges ausgeübt wird. Die Nadel wird in einem Winkel von 30 Grad in den medialen Augenwinkel eingeführt und entlang des Augapfels zur Basis des Auges geführt. Dabei zeigt die Schräge des angeschliffenen Konus nach unten, um eine Verletzung des Augapfels zu vermeiden (Yardeni et al., 2011).

2.4.2.5 Intraplantare Injektion

Die Intraplantare Injektion in die Fußsohle der Maus wird hauptsächlich in Immunisierungsstudien genutzt. Sie ist eine Kombination aus intradermaler und subkutaner Injektion, bei der der Lymphabfluß direkt zum Kniekehlymphknoten (Lnn. Popliteus) (Kawashima et al., 1964) und dann weiter zu den iliakalen (Van den Broeck et al., 2006, Tilney, 1971) und inguinalen Lymphknoten erfolgt (Tilney, 1971).

Anhand der Größenzunahme dieser Lymphknoten oder der gewonnenen Menge an Lymphozyten können in verschiedenen Studienansätzen Rückschlüsse auf die Heftigkeit möglicher Immunreaktionen gezogen werden. Auch das Auftreten einer lokalen Schwellung nach der Injektion eines Antigens wird als objektive, sensitive und schnelle Immunantwort in vivo gesehen. Für die Produktion von Antikörpern wird häufig ein Antigen in die Fußsohle appliziert (Kamala, 2007).

Die Fußsohle der Maus ist sehr empfindlich. Injektionen sollen nicht in eine der beiden Vorderpfoten erfolgen, da diese zur Futteraufnahme und zum Komfortverhalten wie beispielsweise dem Putzen der Tiere genutzt werden. Im Bereich der Hinterpfoten trägt die Fußsohle einen großen Anteil des Gewichts des Tieres. Eine durch die Injektion ausgelöste Entzündung kann zu Schmerz und Mobilitätseinschränkung des Tieres führen (Fox et al., 2007). Die Injektion in die Fußsohle der Hinterpfoten darf nur einseitig und unter der Bedingung erfolgen, dass das Tier auf weicher Einstreu untergebracht wird. Das empfohlene maximale Injektionsvolumen beträgt 0,01- 0,05 ml pro Tier (Jackson und Fox, 1995).

In der Literatur wird gefordert, dass intraplantare Injektion nur mit einer speziellen wissenschaftlichen Begründung erfolgen soll (Morton et al., 2001, Fox et al., 2007, Kamala, 2007, Jackson und Fox, 1995). Bei Immunisierungsversuchen kann als Alternative die Injektion in das Sprunggelenk gewählt (Kamala, 2007).

2.4.2.6 Schlundsondierung

Bei der Schlundsondierung wird eine bestimmte Substanzmenge direkt in den Magen verabreicht. Die Absorption findet im Gastrointestinaltrakt statt. Es werden meist starre Sonden verwendet, an deren Vorderende sich eine kleine Verdickung befindet (Knopfkanüle). Diese soll vor allem Verletzungen verhindern und das Einführen erleichtern. Bei einer Maus von 20 g KGW soll bei der Schlundsondierung ein maximales Volumen von 1 ml nicht überschritten werden und die Sondengröße soll nicht mehr als 1 mm betragen (Weiss et al., 2014).

Zur Eingabe muss die Maus in einer aufrechten, vertikalen Position gehalten werden. Die Sondennadel wird an der Seite des Mauls entlang des Gaumens geführt und vorsichtig in die Speiseröhre in Richtung des Magens eingeführt. Dabei darf kein Widerstand zu überwinden sein.

2.5 Zielsetzung und Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit war es die Belastung von Mäusen durch unterschiedliche Injektionstechniken bzw. durch Schlundsondierung mittels telemetrischer Erfassung von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität miteinander zu vergleichen. Durch diese Untersuchung soll der Belastungsgrad vergleichend eingeschätzt und eine objektive Empfehlung für den Einsatz der Techniken gegeben werden.

Folgende Fragestellungen haben wir in dieser Arbeit im Detail bearbeitet:

- Wie stark ist die Belastung durch den physikalischen Stress der Injektion bzw. durch den psychologischen Stress der Fixierung?
- Existieren Belastungsunterschiede zwischen den diversen Applikationstechniken?
- Gibt es stammesspezifische Unterschiede?
- Welche relevanten Untersuchungsphasen sind zu identifizieren?

3 Material und Methoden

3.1 Genehmigung

Dieses Versuchsvorhaben wurde unter dem Aktenzeichen 23 177-07/G 11-1-027 vom Landesuntersuchungsamt Rheinland Pfalz und unter den Aktenzeichen 35-9185.81/G-52/12 und 35-9185.81/G-89/14 vom Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt.

3.2 Mäusstämme

Unterschiedliche Mäusstämme können aufgrund ihrer unterschiedlichen Genetik verschiedene Verhaltensweisen und Reaktionen auf Reize zeigen (Crabbe et al., 1999, Picciotto und Self, 1999, Sousa et al., 2006). Deshalb wurden die telemetrischen Messungen in dieser Studie an drei unterschiedlichen Mäusstämmen vorgenommen und miteinander verglichen. Es wurden Mäuse der Inzuchtstämme C57BL/ 6J und BALB/ c von Charles River Laboratories und des Auszuchtstammes NMRI verwendet. Alle Mäuse waren weiblichen Geschlechtes, um problemlose Gruppenhaltung gewähren zu können. Für die telemetrischen Messungen wurden die Mäuse mit einem Gewicht von ca. 20 g mit einem Transponder versehen. Nach der Transponderimplantation hatten die Tiere eine Erholungszeit von sechs Wochen bevor sie in die einzelnen Versuche überführt wurden.

3.3 Haltung und Fütterung

Die Tiere wurden in Gruppen von vier bis fünf Tieren in durchsichtigen Polycarbonat Filtertop Typ 2 Käfigen (EHRET Labor- und Pharmatechnik GmbH und Co.KG, Emmendingen, Deutschland) mit einer Größe von 207 x 140 x 265 mm und einer Bodenfläche von 363 cm² gehalten. Es wurde ein 12/ 12 Stunden Hell- Dunkel- Zyklus mit Lichtphasen von 7 Uhr bis 19 Uhr und Dunkelphasen von 19 Uhr bis 7 Uhr eingehalten. Für die telemetrischen Messungen wurde zwei Wochen vor Beginn des jeweiligen Versuches jedes mit einem Transponder ausgestattete Tier in einen einzelnen Käfig zusammen mit einer Partnermaus ohne Transponder gesetzt und in den Telemetrieräum verbracht.

Für die Corticosteronbestimmungen wurden die Tiere lediglich 24 Stunden vor der Versuchsdurchführung in ihrem Tierraum einzeln in Käfige gesetzt.

Die Lufttemperatur betrug $22\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$, und es herrschte eine Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$.

Als Einstreu wurden staubfreie Weichholzpellets (Lignocel FS 14, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) verwendet. Den Tieren stand als Futter eine pelletierte Alleindiät

(ssniff® R/M-H, Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) sowie Leitungswasser ad libitum zur Verfügung.

Jeder Käfig enthielt ferner Zellstoffpapier und eine 15 cm lange Kunststoffröhre als Enrichment-Komponente (siehe Abbildung 7).



Abbildung 7: Käfig Setup der Mäuse im Telemetriereraum.

Die Mäuse wurden einmal wöchentlich in einen Käfig mit frischer Einstreu umgesetzt und das Futter und Wasser wurden ausgetauscht.

Die Haltung der Tiere und die Durchführung der Versuche fanden in einem nur für Tierpfleger und Experimentatoren zugänglichen Raum statt, um Störungen zu vermeiden. Während der Messungen hatten lediglich die Experimentatoren Zutritt.

3.4 Radiotelemetrische Technik

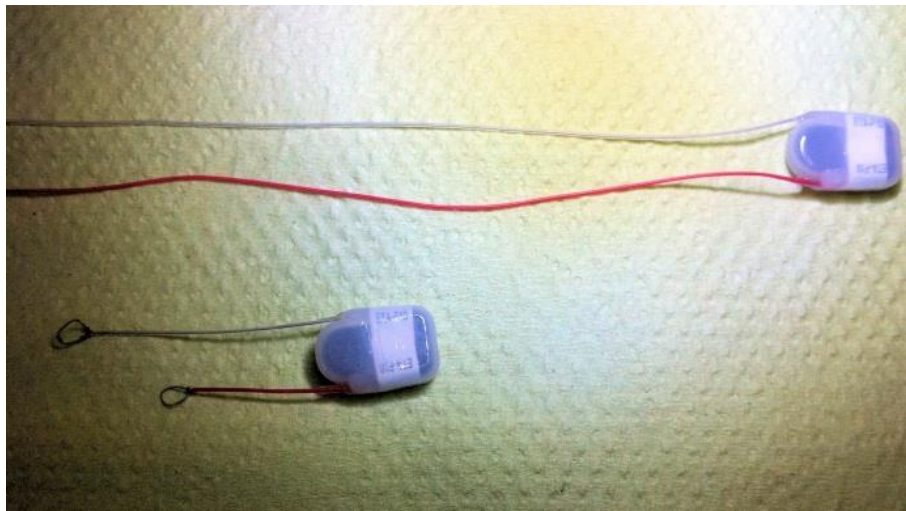
3.4.1 Methoden der Radiotelemetrie

Bei der kabellosen Radiotelemetrie werden die erfassten Parameter der Mäuse mit Hilfe von Funkwellen in auswertbare Daten umgewandelt und vom Tier auf die Telemetrieanlage übertragen.

Durch diese Methode ist es möglich, kontinuierlich die Parameter Herzfrequenz, Aktivität und Temperatur der Tiere zu erfassen ohne sie dabei durch die Anwesenheit des Menschen oder durch Manipulationen im Umfeld der Tiere zu stören.

Dazu wurde in dieser Arbeit die Telemetrieanlage der Firma Data Science International (DSI, St. Paul, MN, USA) genutzt. Den Mäusen wurde ein Transponder des Typs TA11ETA-F10 (DSI, St. Paul, MN, USA) implantiert. Dieser Transponder wiegt 1,6 g und darf nur in die Bauchhöhle von Mäusen mit einem Mindestgewicht von 20 g eingebracht werden. Die Laufzeit des Transponders ist durch die Batterie auf zwei Monate begrenzt. Er kann durch einen Magneten ein- und ausgeschaltet werden.

Die Transponder werden steril verpackt geliefert. Wie Abbildung 8 zeigt, bestehen sie aus einem versiegelten, biokompatiblen Gehäuse und zwei mit verschieden farbigem Kunststoff überzogenen, flexiblen Elektroden. In dem Gehäuse befinden sich eine Batterie und die Empfangseinheit. Die beiden Elektroden müssen direkt vor der Implantation auf eine an die Maus angepasste Länge gekürzt werden. Die mit dem roten Kunststoff überzogene, positive Elektrode wird auf eine Länge von ca. 4,2 cm gekürzt, die mit dem weißen Kunststoff überzogene, negative Elektrode auf eine Länge von ca. 6,0 cm. Das distale Ende der Elektroden wird von der Kunststoffummantelung befreit (rot 1,5 cm lang, weiß 1,0 cm lang) und die nun frei liegende Spirale der Elektrode zu einer Schlaufe geformt und mit einem Seidenfaden (PERMA-Handseide, 6-0, Ethicon, Norderstedt, Germany) als Schlaufe fixiert.



*Abbildung 8: Transponder des Typs TA11ETA-F10 der Firma DSI.
Oben ein Transponder mit ungekürzten Elektroden, unten ein Transponder nach dem Kürzen der Elektroden und mit Bildung einer Schlaufe am Elektrodenende*

Der Käfig einer transponderimplantierten Maus wurde auf einen Receiver der Firma DSI gestellt. Der Receiver hat die Form einer Platte und deckt die gesamte Fläche ab, den die Maus in ihrem Käfig zur Verfügung hat. In jedem Käfig kann aus messtechnischen Gründen nur eine Maus mit einem implantierten Transponder gehalten werden. Die einzelnen Messanlagen müssen in einem ausreichenden Abstand zueinander angeordnet sein, um gegenseitige Störungen zu vermeiden.

Die vom Transponder empfangenen physiologischen Parameter der Maus werden in Radiofrequenzsignale umgewandelt und an den Receiver gesandt, der diese über ein Kabel zu der sogenannten Data Exchange Matrix weiterleitet. Die Matrix sammelt, filtert und digitalisiert die Signale und leitet sie über ein weiteres Kabel in Echtzeit an einen PC weiter. Dort werden die Daten mit der Software Dataquest A.R.T. von DSI verwaltet, gespeichert und ausgewertet. Der Aufbau der Telemetrieanlage ist in Abbildung 9 dargestellt.

Die Elektroden des Transmitters zeichnen ein Elektrokardiogramm auf, was dann in die Herzfrequenz umgerechnet wird. Der Sensor leitet außerdem die gemessene Körperkern-temperatur weiter. Zur Messung der Aktivität werden die Schwankungen der Signalstärke genutzt, die sich durch die Bewegung der Maus innerhalb des Messkäfigs ergeben. Die Aktivität wird in Signalstärkenveränderungen pro Minute angegeben. Diese Signale spiegeln keine spezifischen Bewegungen wider, sondern geben lediglich eine Schätzung der allgemeinen Bewegungsaktivität. Die Aktivität wird in willkürlichen Einheiten (arbitrary unit, AU) angegeben.

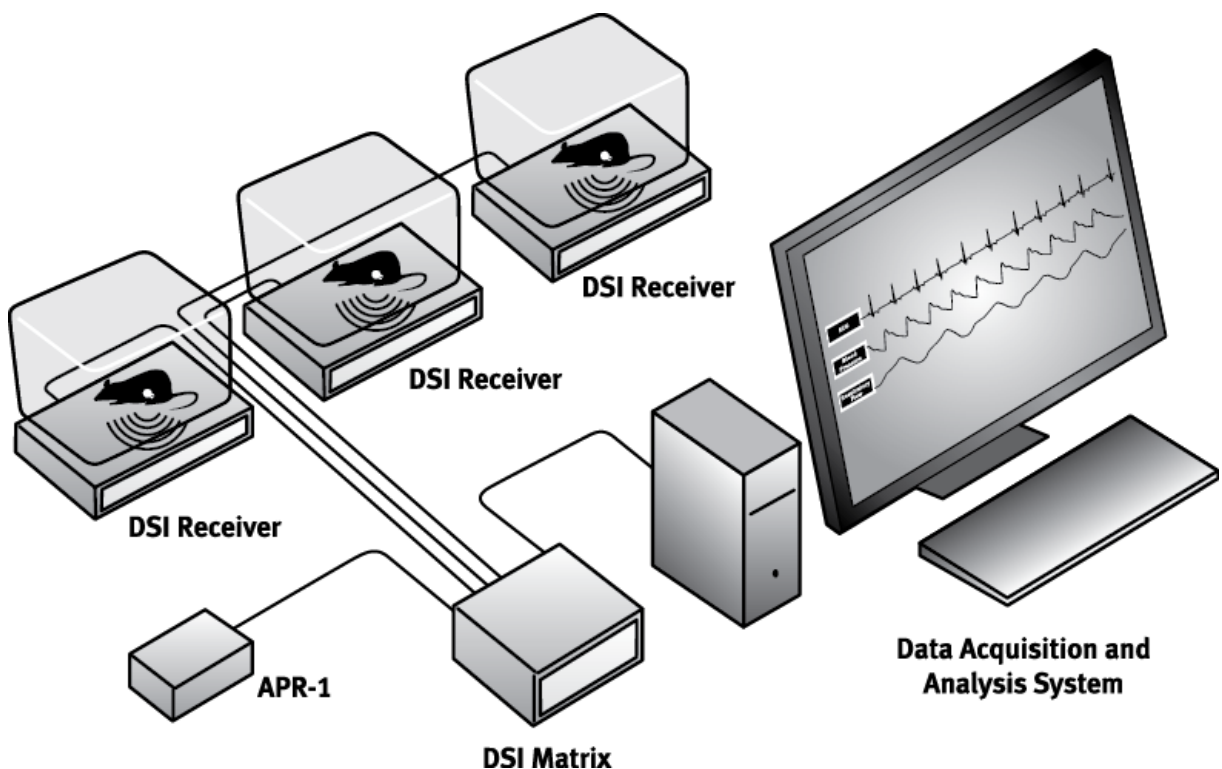


Abbildung 9: Aufbau der Telemetrieanlage.
(Copyright © DSI)

3.4.2 Implantation des Senders

Zur Erhebung der Daten von Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität wird den Mäusen ein Transponder der Firma DSI International (TA11ETA-F10, DSI, St. Paul, MN, USA) implantiert.

3.4.2.1 Präoperative Maßnahmen

Die Mäuse wurden zwei Tage vor der Transponderimplantation mit Isofluran (Forene® , Abbot GmbH, Wiesbaden) und medizinischem Sauerstoff (500 mL/min, Fa. Linde, München) in einer Plexiglaskammer der Größe 8x 8x 8 cm anästhesiert. Nach Verlust des Fußsohlenreflexes wurden sie auf das Arbeitsfeld auf den Rücken gelegt, um die Haut auf der ventralen Seite von der Mandibularregion bis zum kaudalen Endes des Bauchbereiches zu rasieren. Anschließend wurden die Mäuse zurück in ihren Käfig gesetzt und beobachtet bis sie wieder vollständig erwacht waren. Alle Tiere waren für die Rasur maximal fünf Minuten in Narkose.

Der Transponder wurde wie beschrieben vorbereitet und in Kochsalzlösung zur Aufbewahrung (NaCl 0,9 %, B.Braun, Melsungen, Deutschland) bereitgestellt.

3.4.2.2 Transponderimplantation

Vor der Operation wurden die Mäuse gewogen und erhielten anschließend an ihr Gewicht angepasst ein Gemisch aus Fentanyl (0,05 mg/kg KW, Fentanyl®, Janssen GmbH, Neuss) und Midazolam (5 mg/kg KW, Dormicum®, Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen) subkutan für die Narkoseeinleitung und präventive Analgesie.

Nach dieser Injektion wurden die Tiere zurück in ihren Käfig gesetzt und erst nach Wirkungseintritt des Gemisches in das Narkosegerät verbracht. Dabei wurde die Nase vollständig im Inhalationsgerät untergebracht. Die Augen wurden mit Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer HealthCare AG, Leverkusen) gegen Austrocknung geschützt. Die Narkoseerhaltung erfolgte durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene®, Abbot GmbH, Wiesbaden) und medizinischem Sauerstoff (Fa. Linde, München). Die Isoflurankonzentration betrug 2,5 % in 5 l/min Sauerstoff.

Um einer Hypothermie der Tiere vorzubeugen, wurde das Operationsfeld während der gesamten Operation durch eine elektrisch regulierbare Wärmematte auf 38 °C beheizt.

Die Lagerung der Tiere erfolgte auf dem Rücken auf einer sterilen Operationsunterlage, so dass sich die Nase im Narkosegerät befand. Die Operation fand unter einem Stereomikroskop statt.

Die bereits rasierte Region wurde direkt vor dem Eingriff desinfiziert (Kodan Tinktur Forte, Schülke und Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland). In der ventralen Mittellinie wurde die Haut am Sternum und unterhalb der Mandibularregion am Hals ca. 0,5 cm in longitudinaler Richtung inzisiert und die Haut zwischen den Bereichen mit Hilfe einer Pinzette stumpf mobilisiert und untertunnelt.

Die negative Elektrode des Transponders wurde in die Untertunnelung von kaudal nach kranial geschoben, so dass der Teil der Elektrode mit der weißen Ummantelung unterhalb der Haut lag und das Elektrodenende mit der Schlaufe am Hals wieder austrat. Der Transponderkörper lag anschließend auf einer sterilen Kompresse auf der rechten Seite des Tieres und wurde mit NaCl feucht gehalten. Nach einer Erweiterung der Inzision am Hals bis zur Mandibularregion wurden die submandibulären Speicheldrüsen vorsichtig getrennt und stumpf auf der rechten Seite der Trachea in die Tiefe präpariert. Die Muskelschichten wurden mit großer Vorsicht so voneinander getrennt, dass eine Höhle zwischen den Muskelschichten des M. semispinalis capitis und M. semispinalis cervicis rechts von der Trachea und ventral vom Schulterblatt entstand.

Die Schlinge des Elektrodenendes wurde in der entstandenen Höhle positioniert und an zwei Stellen mit einem nicht resorbierbaren Seidenfaden (PERMA-Handseide, 6-0, Ethicon, Norderstedt, Germany) am Muskel fixiert, damit ein Verrutschen der Elektrode verhindert wird. Anschließend erfolgte die Reponierung der submandibulären Speicheldrüsen und der Wundverschluss mit resorbierbaren Fäden (VICRYL 6-0, Ethicon, Norderstedt, Germany). Die Haut in der Halsregion wurde abschließend mit Hautklammern (Precise, 3 M Health Care, St. Paul, MN, USA) adaptiert.

Die Inzision am Sternum wurde ca. 1,5 cm entlang des Bauches nach kaudal erweitert und die Bauchhöhle an der Linea alba bis zum Processus xiphoideus eröffnet. Der Transponder wurde so in die rechte Seite der Bauchhöhle eingeführt, dass die Schlinge am Ende der positiven, roten Elektrode direkt unterhalb des Proc. xiphoideus zum Liegen kam. Die Schlinge wurde an zwei verschiedenen Stellen am Xiphoid mit nicht resorbierbaren Seidenfäden (PERMA-Handseide, 6-0, Ethicon, Norderstedt, Germany) fixiert, so dass sie zwischen der Leber und dem Diaphragma in der linken oberen Abdominalgegend verblieb.

Vor dem Wundverschuß wurde als antibiotische Prophylaxe vor Infektionen Sulfadoxin und Trimethoprim (30 mg/kg und 6 mg/kg, Borgal®, 7,5 % ad us.vet., Virbac, Carros, Frankreich) gemischt mit 1 ml Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, B.Braun, Melsungen, Deutschland) zum Entgegenwirken einer Dehydratation in die Bauchhöhle eingegeben. Das Schließen der Bauchmuskelschichten erfolgte mit einer fortlaufenden Naht mit einem resorbierbaren Faden (VICRYL 6-0, Ethicon, Norderstedt, Germany). Die Haut der Bauchregion wurde mit Hautklammern (Precise, 3 M Health Care, St. Paul, MN, USA) adaptiert. Die Gesamtzeit der Operation von der Narkoseeinleitung bis zum Hautverschluss betrug in etwa 40 Minuten.

3.4.2.3 Postoperative Maßnahmen

Als Schmerzprophylaxe wurde den Tieren am Ende der Transponderimplantation Buprenorphin (0,1 mg/kg KG, Temgesic, Essex Chemie AG, Lucerne, Switzerland) subkutan injiziert.

Zur besseren Erholung der Tiere verblieben diese für zwei Stunden post operationem unter Beobachtung auf einer Wärmematte mit einer Temperatur von 38,5 °C. Anschließend wurden die Mäuse zurück in ihren Telemetrieräum gesetzt.

Dem Trinkwasser wurde 2 g Glucose zugefügt für die erste Woche nach der Operation. Zur Analgesie von postoperativen Schmerzen bekamen die Mäuse zweimal täglich Buprenorphin subkutan injiziert (0,1 mg/kg KG, Temgesic, Essex Chemie AG, Lucerne, Switzerland). Die Nachkontrolle erfolgte durch ein sehr genaues Monitoring des Allgemeinzustandes, der Futteraufnahme und des Verhaltens der Tiere.

14 Tage nach der Operation wurden die Mäuse mit Isofluran (Forene® , Abbot GmbH, Wiesbaden) und medizinischem Sauerstoff (500 mL/min, Fa. Linde, München) in einer Plexiglas-kammer der Größe 8x 8x 8 cm anästhesiert. Nach Verlust des Fußsohlenreflexes wurden sie auf dem Arbeitsfeld auf den Rücken gelegt und die Klammern mit einem Entklammerer (Precise, 3 M Health Care, St. Paul, MN, USA) entfernt. Anschließend wurden die Tiere zurück in ihren Käfig gesetzt und beobachtet bis sie wieder vollständig erwacht waren. Alle Tiere waren für das Entfernen der Klammern maximal drei Minuten in Narkose.

3.4.3 Radiotelemetrische Messung

Die Messungen begannen sechs Wochen nach der Transponderimplantation. Die Werte wurden kontinuierlich alle zehn Sekunden gemessen und aufgezeichnet. Die Messung fand also durchgehend vom manuell eingestellten Beginn bis zur manuellen Beendigung statt. Während der Messungen blieben die Tiere in der gewohnten Umgebung in ihren Käfigen mit einer nicht transponderten, andersfarbigen Gesellschaftsmaus und uneingeschränktem Zugang zu Futter und Wasser ohne Anwesenheit eines Menschen. Der Raum wurde ausschließlich für telemetrische Messungen genutzt, so dass eine möglichst ruhige und stressfreie Umgebung gesichert war. Der Zugang zu dem Raum fand nur in Absprache statt. Die Übertragung der radiotelemetrischen Daten erfolgte wie bereits beschrieben über den implantierten Telemetriesender alle zehn Sekunden auf den Computer, so dass anschließend die Daten mit Hilfe der erwähnten Software, Microsoft Excel 2010 und dem Statistikprogramm Sigma Plot Version 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) ausgewertet und als Mittelwert aller Tiere zu einem bestimmten Zeitpunkt dargestellt werden konnten.

3.5 Versuchsdurchführung

Die Mehrzahl der Versuche fand in der Helligkeitsperiode statt und wurde von der gleichen, routinierten Person am gleichen Wochentag zur gleichen Uhrzeit im störungsfreien Telemetrieräum durchgeführt. Lediglich ein Experiment fand in der Dunkelperiode der Tiere statt. Die

Manipulationen erfolgten immer direkt am Käfig der jeweiligen Maus auf dem Receiver der Telemetrieanlage, damit es keine Unterbrechung der Messung gab. Nach Abschluss eines Versuches wurde der Raum sofort von der Experimentatorin verlassen, um keine Störungen der Messungen durch die Anwesenheit eines Menschen zu erhalten.

3.5.1 Gruppeneinteilung der Applikationsmethoden

Tabelle 3 fasst die Anzahl (n) der telemetrischen Messungen in dieser Studie von Versuchsgruppe und Kontrollgruppe bei den unterschiedlichen Applikationstechniken und unterschiedlichen Mausstämmen zusammen. Bei einigen Versuchsansätzen wurde die Messung nach der Arousalphase angehalten. In diesen Versuchen fehlt die Auswertung des circadianen Rhythmus und führt zu einer reduzierten Anzahl an Messungen für diesen Zeitraum. In diesem Fall ist in der Tabelle 3 die Anzahl an Messungen für den circadianen Rhythmus in Klammern dargestellt.

Tabelle 3: Anzahl der Messungen in den einzelnen Versuchen.

Stamm	Applikationstechnik	Anzahl der Messungen der Versuchsgruppe	Anzahl der Messungen der Kontrollgruppe
B6	sc	10	10
B6	iv	10	10
B6	ip	10	10
B6	ipl	10	10
B6	og	10	12
B6	rb (1. Experiment)	12	11
B6	rb (2. Experiment)	9	9
BALB/ c	sc	11 (7)	11 (7)
BALB/ c	iv	10 (6)	12 (7)
BALB/ c	ip	11 (7)	12 (7)
BALB/ c	ipl	11 (7)	12 (7)
BALB/ c	og	12	12
BALB/ c	sc in der Dunkelperiode	12	12
NMRI	sc	13	13
NMRI	iv	11	11
NMRI	ip	12	12
NMRI	ipl	12	12

Die Tabelle zeigt die Anzahl (n) der Messungen von Versuchsgruppe und Kontrollgruppe bei den unterschiedlichen Mausstämmen und unterschiedlichen Applikationsmethoden.

3.5.1.1 Einteilungen der Injektionstechniken

Es wurden jeweils 16 weiblichen Tieren der Stämme C57BL/ 6J, BALB/ c und NMRI ein Transponder implantiert. Die Mäuse wurden innerhalb der Stämme in zwei Gruppen eingeteilt. An jedem Versuchstag wurde eine Gruppe gemessen. Alternierend wurden die Tiere in Versuchsgruppe und Kontrollgruppe untergliedert. Bei der Versuchsgruppe wurden die Fixierungstechniken mit der entsprechenden Injektionstechnik (subkutan, intraperitoneal, intravenös und intraplantar) durchgeführt. Bei der Kontrollgruppe wurden die Tiere alleine den jeweiligen Fixierungen unterzogen. Sowohl die Art der Fixierung, als auch die Dauer waren bei beiden Gruppen immer gleich. Die Tabelle 4 zeigt, dass die Manipulationen nach einem Rotationsschema erfolgten, um den Einfluss individueller Reaktionen zu minimieren. Zwischen den einzelnen Versuchen lag jeweils eine Woche, so dass zwischen zwei Injektionen an derselben Maus vier Wochen Zeit lag. Jede Maus wurde maximal drei unterschiedlichen Injektionstechniken und drei unterschiedlichen Fixierungstechniken unterzogen.

Tabelle 4: Versuchsplan (sc, iv, ip, ipl).

	sub- kutane Injektion	subkutan Kontrolle	intra- venöse Injektion	intra- venöse Kontrolle	intraperi- toneale Injektion	intraperi- toneale Kontrolle	intra- plantare Injektion	intra- plantare Kontrolle
1. Termin Gruppe 1	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6	Maus 7	Maus 8
2. Termin Gruppe 2	Maus 9	Maus 10	Maus 11	Maus 12	Maus 13	Maus 14	Maus 15	Maus 16
3. Termin Gruppe 1	Maus 8	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6	Maus 7
4. Termin Gruppe 2	Maus 16	Maus 9	Maus 10	Maus 11	Maus 12	Maus 13	Maus 14	Maus 15

Versuchsplan: ein Rotationsschema für die subkutane, intravenöse, intraperitoneale und intraplantare Injektion.

3.5.1.2 Einteilungen der retrobulbären Injektion

1. Versuch

Für die Belastungserfassung der retrobulbären Injektion wurden 12 C57BL/ 6J Weibchen mit einem Transponder versehen und in zwei Gruppen eingeteilt. An jedem Versuchstag wurde eine Gruppe gemessen. Die Tiere einer Gruppe wurden an verschiedenen Versuchsterminen in Versuchs- oder Kontrollgruppe alternierend eingeteilt. Die Versuchsgruppe wurde der retrobulbären Injektion während der Kurzzeitinhalationsnarkose unterzogen, während die Kontrollgruppe alleine in die Kurzzeitinhalationsnarkose versetzt wurde. Dabei war die Dauer, in

der sich die Tiere in Narkose befanden, bei beiden Gruppen immer gleich. Zwischen den einzelnen Versuchen lagen jeweils zwei Wochen, so dass zwischen einer retrobulbären Injektion in Narkose und der Narkose ohne Injektion an einer Maus zwei Wochen Zeit zur Erholung lagen. Jede Maus wurde also einmal der retrobulbären Injektion und einmal der Inhalationsnarkose ohne Injektion unterzogen (siehe Tabelle 5). Da bei einer Maus in der Kontrollgruppe die Messung fehlerhaft war, wurde sie nicht für die Auswertung berücksichtigt. Somit ergeben sich für den 1. retrobulbären Versuch in der Versuchsgruppe 12 Messungen (n= 12) und für die Kontrollgruppe 11 Messungen (n= 11) (siehe Tabelle 3).

Tabelle 5: Versuchsplan (rb).

	retrobulbäre Injektion	retrobulbäre Kontrolle	retrobulbäre Injektion	retrobulbäre Kontrolle	retrobulbäre Injektion	retrobulbäre Kontrolle
1. Termin Gruppe 1	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6
2. Termin Gruppe 2	Maus 7	Maus 8	Maus 9	Maus 10	Maus 11	Maus 12
3. Termin Gruppe 1	Maus 6	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5
4. Termin Gruppe 2	Maus 12	Maus 7	Maus 8	Maus 9	Maus 10	Maus 11

Versuchsplan für den 1. Versuch der retrobulbären Injektion bei C57BL/ 6J Mäusen

Da die retrobulbäre Injektionsmethode zum Zeitpunkt der Studie von der GV- SOLAS als eine grundsätzlich nicht empfohlene Injektionsmethode mit einer sehr hohen Anforderung an die Fertigkeit des Durchführenden eingeschätzt wurde (GV-SOLAS, 2012) , wurde im Hinblick auf das von Russel und Burch geforderte Refinement der 3R, dieser Versuchsansatz ausschließlich mit C57BL/ 6J Weibchen durchgeführt. Es fand eine Wiederholung dieses Versuches unter gleichen Bedingungen mit C57BL/ 6J Mäusen statt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu untersuchen.

2. Versuch

Der 2. Versuch der retrobulbären Injektion fand entsprechend dem 1. Versuch statt. Es wurden abermals 12 C57BL/ 6J weibliche Mäuse mit einem Transponder versehen und in zwei Gruppen eingeteilt. An jedem der drei Versuchstage wurden die Mäuse einer Gruppe alternierend in Versuchsgruppe und Kontrollgruppe aufgeteilt und entsprechend der retrobulbären Injektion während der Kurzzeitinhalationsnarkose oder alleine der Kurzzeitinhalations-

narkose unterzogen. Im 2. Versuch ergibt sich eine Versuchszahl von 9 Messungen ($n = 9$) sowohl für die Versuchs- als auch für die Kontrollgruppe (siehe Tabelle 3).

3.5.1.3 Einteilungen der Schlundsondierung

8 C57BL/ 6J und 6 BALB/ c Weibchen wurden jeweils randomisiert in Versuchsgruppe und Kontrollgruppe eingeteilt. Die Tiere der Versuchsgruppe wurden der Schlundsondierung unterzogen. Die Kontrollgruppe erhielt keine Schlundsondierung sondern wurde lediglich entsprechend fixiert. Dabei erfolgte die Manipulation rotierend, um den Einfluss individueller Reaktionen zu minimieren (siehe Tabelle 6). Der Abstand zwischen den Versuchen betrug jeweils eine Woche, so dass eine zeitliche Pause von zwei Wochen zwischen zwei Schlundsondierungen an einer Maus eingehalten wurde. Eine Maus wurde maximal zwei Mal schlundsondiert. Durch Messfehler konnten zwei C57BL/ 6J Mäuse der Versuchsgruppe nicht berücksichtigt werden, so dass sich die in Tabelle 3 beschriebene Versuchszahl (n) ergibt.

Tabelle 6: Versuchsplan (og).

	Schlund- sondierung	Schlund- sondierung Kontrolle	Schlund- sondierung	Schlund- sondierung Kontrolle	Schlund- sondierung	Schlund- sondierung Kontrolle
1. Termin	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6
2. Termin	Maus 6	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5
3. Termin	Maus 5	Maus 6	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4
4. Termin	Maus 4	Maus 5	Maus 6	Maus 1	Maus 2	Maus 3

Versuchsplan für die Schlundsondierung bei BALB/ c Mäusen.

3.5.1.4 Einteilungen der subkutanen Injektion während der Dunkelperiode

Ein weiterer Versuch fand zu Beginn der Dunkelperiode (20.30Uhr) statt. Hierfür wurden 8 BALB/ c Weibchen mit einem Transponder versehen und an drei verschiedenen Versuchsterminen in zwei Gruppen (Versuchsgruppe und Kontrollgruppe) alternierend eingeteilt (siehe Tabelle 7). In der Versuchsgruppe fand die Fixierung mit einer subkutanen Injektion statt, in der Kontrollgruppe wurden die Mäuse jeweils nur fixiert. Der Versuch fand an drei verschiedenen Terminen statt, so dass sich eine Versuchszahl von 12 Messungen ($n = 12$) sowohl für die Versuchs- also auch für die Kontrollgruppe ergibt (siehe Tabelle 3).

Tabelle 7: Versuchsplan (sc in der Nachtperiode).

	sub- kutane Injektion	sub- kutan Kontrolle	sub- kutane Injektion	sub- kutan Kontrolle	sub- kutane Injektion	sub- kutan Kontrolle	sub- kutane Injektion	sub- kutan Kontrolle
1. Termin	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6	Maus 7	Maus 8
2. Termin	Maus 8	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6	Maus 7
3. Termin	Maus 7	Maus 8	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6

Versuchsplan für die subkutane Injektion zu Beginn der Dunkelperiode bei BALB/c Mäusen

3.5.2 Formen der Applikation

3.5.2.1 Subkutane Injektion

Für die subkutane Injektion wird bei der Maus die interskapuläre Gegend und die Kniefalte genutzt, weil dort leicht Hautfalten anzuheben sind.

In dieser Arbeit haben wir uns an die Vorgaben der GV- SOLAS 2004 gehalten (GV-SOLAS et al., 2010, Quesenberry und Carpenter, 2004) und das für die Maus zugelassene Höchstvolumen für die subkutane Injektion von 0,3 ml NaCl Lösung mit einer 25 G Kanüle in die interskapuläre Gegend subkutan injiziert (siehe Abbildung 10). Die Mäuse wurden mittels Nackengriff im Nackenfell gegriffen und fixiert. Die Kanüle konnte so parallel zum Tierkörper eingeführt werden und die Kochsalzlösung subkutan injiziert werden.

Die Kontrollgruppe wurde jeweils nur mit dem Nackengriff fixiert und es erfolgte keine Injektion. Nach der Injektion bzw. der bloßen Fixierung wurden die Tiere direkt in ihren Messkäfig zurückgesetzt.



Abbildung 10: Fixierungstechnik und Darstellung der subkutanen Injektion bei einer C57BL/ 6J Maus.

3.5.2.2 Intraperitoneale Injektion

Für die intraperitoneale Injektion wurden die Mäuse im Nackengriff fixiert und in die Trendelenburg Position gebracht, so dass die Maus auf dem Rücken lag, der Kopf nach unten zeigte und die Hinterläufe die höchste Position hatten (siehe Abbildung 16). Die Einstichstelle befand sich im kaudalen Drittel auf der rechten Seite des Tieres nahe der Medianen (siehe Abbildung 11). Der Einstich der Nadel erfolgte im 10- 30 Grad Winkel und nicht zu tief (Quesenberry und Carpenter, 2004). Das Injektionsvolumen nach GV- SOLAS betrug 0,3 ml einer NaCl Lösung und die Injektion erfolgte mit einer 25 G Kanüle (GV-SOLAS et al., 2010).

Bei der Kontrollgruppe fand die Fixierung im Nackenfell in der Trendelenburg Position statt ohne eine Injektion in die Bauchhöhle.

Nach der Injektion oder der bloßen Fixierung wurden die Tiere direkt in ihren Messkäfig zurückgesetzt.

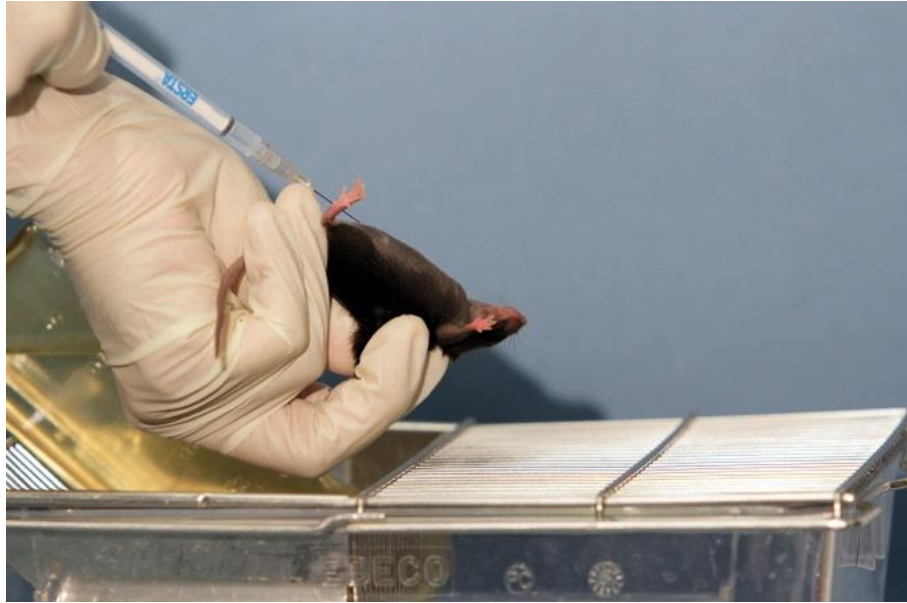


Abbildung 11: *Fixierungstechnik und Darstellung der intraperitonealen Injektion bei einer C57BL/ 6J Maus.*

3.5.2.3 Intravenöse Injektion

Intravenöse Injektion in die Schwanzvene

Für die intravenöse Injektion wurden die Mäuse in einem Perspex Restrainter fixiert (siehe Abbildung 12). Bei der Kontrollgruppe erfolgte nur die Fixierung ohne Injektion.

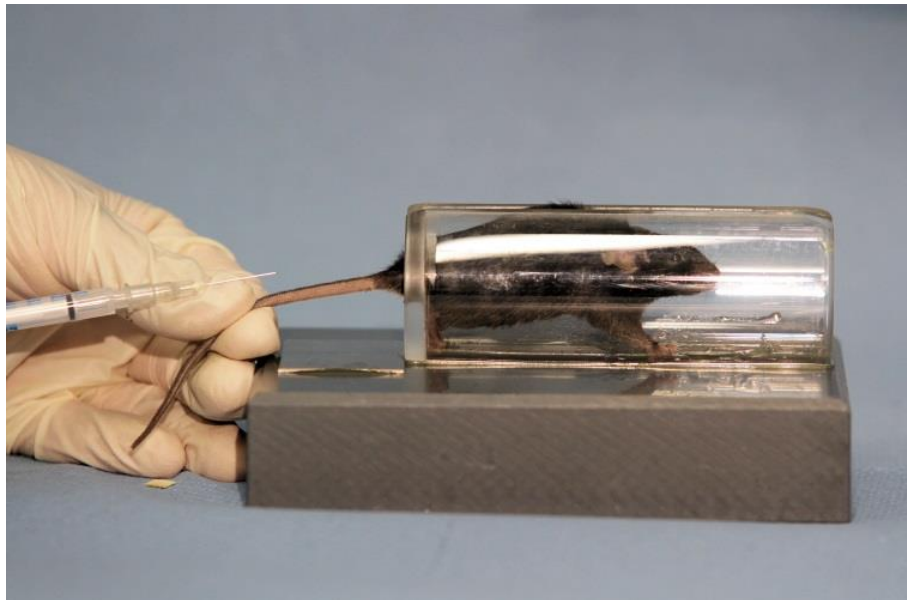


Abbildung 12: *Fixierungstechnik in einem Perspex Restrainter und Darstellung der intravenösen Injektion in die Schwanzvene bei einer C57BL/ 6J Maus.*

Um die Schwanzvene besser zugänglich zu machen, wurde der Schwanz für fünf Sekunden in warmes Wasser (40- 45 °C) getaucht, so dass die laterale Schwanzvene dilatierte (Quesenberry und Carpenter, 2004).

Nach GV- SOLAS Vorgabe wurde eine 26 G Nadel im mittleren Drittel des Schwanzes 2- 4 mm tief in das Lumen der rechten Schwanzvene vorgeschoben und 0,15 ml NaCl Lösung injiziert (GV-SOLAS et al., 2010, Fox et al., 2007). Anschließend wurden die Tiere direkt in ihren Käfig zurückgesetzt.

Intravenöse Injektion in den retrobulbären Venenplexus

Für die retrobulbäre Injektion wurden die Mäuse in eine kurzzeitige Isofluraninhalationsnarkose (Isofluran, Forene®, Abbot GmbH, Wiesbaden und medizinischem Sauerstoff 500 mL/min, Fa. Linde, München) gelegt (siehe Abbildung 13). Die Mäuse wurden für die Narkoseeinleitung im Nackengriff fixiert und die Nase in die Atemmaske gehalten. Zur Einleitung betrug die Isoflurankonzentration ca. 4 % in 500 ml/ min Sauerstoff. Sobald das Toleranzstadium erreicht war, wurde die Konzentration auf 2 % reduziert. Die Maus wurde während der Narkose auf einer Wärmematte positioniert. Eine 30 G Nadel verbunden mit der Kanüle über einen dünnen Plastikschauch wurde vorsichtig am Auge im medianen Augenwinkel entlang der Augenhöhle in den retroorbitalen Venenplexus eingeführt bis beim Aspirieren Blut in den Plastikschauch trat. Anschließend wurden 50 µl NaCl Lösung injiziert (Quesenberry und Carpenter, 2004). Die Mäuse wurden anschließend direkt in ihren Käfig zurückgesetzt. Die Injektion hatte jeweils eine Dauer von 30 Sekunden. Bei der entsprechenden Fixierung als Kontrolle wurde die Maus ebenso dieser Inhalationsnarkose mit der gleichen Dauer ausgesetzt.



Abbildung 13: Darstellung der retrobulbären Injektion bei einer C57BL/ 6J Maus während der Inhalationsnarkose.

3.5.2.4 Intraplantare Injektion

Die Injektion in das Footpad erfolgte in die rechte Hinterpfote. Das empfohlene maximale Injektionsvolumen beträgt 0,05 ml pro Tier. Die Injektion dieses Volumens erfolgte mit einer 27 G Kanüle (Morton et al., 2001).

Zur Injektion in das Footpad wurde die Maus in einem Zentrifugenröhrchen fixiert. Dazu lässt man die Maus in das Röhrchen laufen. Anschließend wird die rechte Hinterpfote außerhalb des Röhrchens festgehalten, so dass die Injektion in das Footpad dieser Hinterpfote stattfinden kann (siehe Abbildung 14).

Die Fixierung in einem Zentrifugenröhrchen ohne Injektion fand in der Kontrollgruppe statt.



Abbildung 14: *Fixierungstechnik und Darstellung der intraplantaren Injektion bei einer C57BL/ 6J Maus.*

In der Abbildung erfolgt die Injektion in die linke Hinterpfote zu Demonstrationszwecken. In unserer Studie wurde strikt die rechte Hinterpfote zur Injektion genutzt.

3.5.2.5 Schlundsondierung

Zur Schlundsondierung wurde die Maus per Nackengriff fixiert und in eine aufrechte Position gebracht. Die Knopfkanüle der Schlundsonde wurde am Diastigma im Maulbereich eingeführt und entlang des Gaumens vorsichtig zur Speiseröhre und dann in Richtung des Magens geschoben. Dabei darf kein Widerstand zu überwinden sein. Appliziert wurden jeweils 500 µl Trinkwasser. Anschließend wurden die Tiere zurück in ihren Käfig gesetzt.

Die Fixierung per Nackengriff in aufrechter Position ohne Schlundsondierung fand in der Kontrollgruppe statt.



Abbildung 15: Darstellung der Schlundsondierung bei einer C57BL/6J Maus.

3.5.3 Corticosteronbestimmung

Um zu untersuchen in welchem Ausmaß die HHNA durch die Applikationsformen aktiviert wird, wurde in einem weiteren Versuchsansatz der Serumcorticosterongehalt bestimmt. Corticosteron ist das vorherrschende Glucocorticoid bei Nagetieren (Kvetnansky et al., 2009). Es ist bekannt, dass die Konzentration des murinen zirkulierenden Corticosteron einem strengen circadianen Rhythmus unterliegt mit einem minimalen Expressionsniveau in der ersten Stunde der Helligkeitsperiode (Dalm et al., 2005). Weiterhin ist der Anstieg der Corticosteronausschüttung bei Erregung sehr ähnlich der Erregungssteigerung der kardiovaskulären Parameter (Meijer et al., 2007). Da die Corticosteronausschüttung aber eine neurohormonale Reaktion darstellt, unterliegt sie einer gewissen Trägheit und es tritt eine signifikante Latenzzeit bis zum Anstieg auf (Benedetti et al., 2012).

3.5.3.1 Probenentnahme zur Bestimmung des Corticosterongehaltes im Blutserum

Den Zeitpunkt der Untersuchung eines möglichen Einflusses einer Applikation auf die HHNA haben wir an den Beginn der Helligkeitsperiode (zwischen 6.30 Uhr und 7.30 Uhr) gelegt. Zu dieser Tageszeit ist die Serumcorticosteronkonzentration am geringsten, so dass eine starke Erhöhung möglich ist. Außerdem haben wir nicht nur einen Corticosteronwert, sondern die gesamte Dynamik der Corticosteronserumsekretion ermittelt. Dazu wurde eine komplexe Serie von Blutproben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Applikation bzw. der Fixierung entnommen. Tabelle 8 zeigt die Anzahl der gemessenen Tiere zu den Zeitpunkten 0, 10, 15, 20, 30, 40, 50 und 60 Minuten nach der Manipulation.

Tabelle 8: Anzahl der Messungen pro Zeitpunkt bei der Corticosteronbestimmung.

Zeitpunkt nach der Manipulation in min	0	10	15	20	30	40	50	60
Anzahl der Messungen der Versuchsgruppe	4	4	5	5	9	9	4	4
Anzahl der Messungen der Kontrollgruppe	6	4	11	6	4	4	4	4

Bei Ratten ist bereits eine Methode für solche Messungen durch einen an einen Akkusamplifier angeschlossenen Venenkatheter etabliert, der automatisch in einem bestimmten Zeitintervall Blut abnimmt (Royo et al., 2004). Bei der Maus gibt es solche zuverlässigen Verfahren nicht, so dass wir in unseren Untersuchungen Einzelblutentnahmen durchgeführt haben. Schon die Blutentnahme per se kann die HHNA aktivieren. Um diesen Einfluss so niedrig wie möglich zu halten, mussten wir die Blutentnahmetechnik wählen, die in der kürzesten Zeit von einem erfahrenen Experimentator durchgeführt werden kann. So erlaubt die Punktion der V. facialis dem Tier innerhalb von zehn Sekunden Blut abzunehmen. Die mittels dieser Entnahmetechnik für die unmittelbar zum Zeitpunkt der Injektion (0 Minuten) erhaltenen Corticosteronwerte stimmen mit den in der Literatur beschriebenen Tageswerten überein (Dalm et al., 2005).

Da die HHNA extrem empfänglich für Störungen durch äußere Reize ist, wurden die Mäuse 24 Stunden vor der Blutentnahme einzeln und in Tierräume mit ausschließlichem Tierpflegerverkehr eingebracht. Zwölf Stunden vor der Blutentnahme wurde der Personenverkehr in diesen Tierräumen komplett eingestellt. Die Blutprobenentnahmen für die Corticosteronbestimmungen fanden zu den Zeitpunkten 0, 10, 15, 20, 30, 40, 50 bzw. 60 Minuten nach der Applikation bzw. der bloßen Fixierungstechnik statt.

Die Blutentnahmen zur Corticosteronbestimmung erfolgten an der Vena facialis. Diese wurde auf der rechten oder linken Seite mit einer Lanzette (Solofix Blutlanzette, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)) 3- 4 mm dorsokaudal des Haarwirbels am Unterkiefer senkrecht zum Kopf punktiert und das Blut im Probenröhrchen (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland) aufgefangen. Die Vene wurde durch das Zurückziehen der Haut bei der Fixierung gestaut. Nach der Blutentnahme wurde zur Vermeidung von Hämatomen die Einstichstelle eine Minute lang komprimiert. Die Blutentnahme dauerte nie länger als zehn Sekunden.

Das Blut wurde nach der Probenentnahme 30 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend zehn Minuten lang bei 3000 U/ min zentrifugiert. Der Überstand (Blutserum) wurde in ein Probenröhrchen pipettiert und bei -20 °C bis zur Probenauswertung eingefroren.

Für die Corticosteronbestimmungen wurden Tiere mehrfach verwendet. Zwischen den einzelnen Versuchen lag jeweils eine Woche.

Die Corticosteronbestimmungen fanden ausschließlich an C57BL/ 6N Weibchen, die einer intraplantaren Injektion (Versuchsgruppe) bzw. der entsprechenden Fixierung (Kontrollgruppe) unterzogen worden waren, statt.

3.5.3.2 Bestimmung des Corticosterongehaltes im Blutserum

Die Auswertung der Blutproben fand mit dem DetectX Corticosterone Enzyme Immunoassay Kit (Arbor Assays, Ann Arbor, MI, USA) entsprechend der Anleitung des Herstellers statt. Bei einem ELISA wird eine bestimmte Substanz spektralphotometrisch quantifiziert. Dazu wird eine Antigen- Antikörperreaktion und eine folgende enzymatische Reaktion ausgelöst. Alle im Kit enthaltenden Reagenzien hatten Raumtemperatur bei der Durchführung des ELISAs. Vor der Testdurchführung wurde das Konzentrat der Testpufferlösung 1:5 und das Waschpufferkonzentrat 1:20 mit deionisiertem Wasser verdünnt. Das Blutserum wurde zunächst mit einem Dissoziierungsreagenz versetzt, damit das vollständige im Blutserum enthaltene Corticosteron ermittelt werden konnte. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde bei jeder Testdurchführung eine Verdünnungsreihe eines Corticosteron Standard mitgeführt. Die Verdünnungen enthielten 5000, 2500, 1250, 625, 312,5, 156,25 und 78,125 pg Corticosteron/ml. Als Kontrolle dienten jeweils zwei Proben mit Testpufferlösung. Eine davon zeigte die nicht spezifische Bindungsreaktion ohne Zugabe von Corticosteron Antikörpern (NSB – non-specific binding), die zweite Kontrolle stellte die maximale Bindung dar (0 pg/ ml). Eine mit Esel anti- Schaf IgG überzogene 96 Wells Platte wurde mit den dissoziierten Blutserumproben, den Standards und den beiden Kontrollen versehen. Anschließend wurde ein DetectX Corticosteron- Peroxidase Konjugat hinzugegeben. Die Bindungsreaktion wurde danach durch Zugabe des polyklonalen DetectX Corticosteron Antikörper ausgelöst. Der DetectX Corticosteron Antikörper wurde nicht zu dem Well mit der NSB Kontrolle dazu gegeben. Die Mikrowellplatte wurde anschließend abgedeckt und bei Raumtemperatur eine Stunde lang geschüttelt, um effiziente Bindungssignale erreichen zu können. Dann erfolgte das Waschen der Platte mit dem Waschpuffer. Nach Zugabe von TMB (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin) Substratlösung wurde die Mikrowellplatte 30 Minuten lang zur Inkubation bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das TMB Substrat reagiert mit dem gebundenen Corticosteron- Peroxidase Konjugat und es kommt zu einer blauen Farbentwicklung, deren Intensität proportional zur Corticosteronkonzentration in der Probe ist. Die Zugabe einer Stopp- Lösung beendet die Reaktion und es folgt ein Farbumschlag von blau zu gelb. Nun erfolgte das Auslesen der optischen Dichte jedes Wells mit dem Spektrophotometer Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Anschließend errechnet

die Software Skanlt Software 4.1 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) anhand der optischen Dichte die jeweilige Corticosteronkonzentration der Proben.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Untersuchungsergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biostatistik des Deutschen Krebsforschungszentrums. Die erhobenen Parameter wurden mit den Programmen SigmaPlot Version 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland), Microsoft Excel 2010 und SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) bearbeitet.

Alle Daten wurden einer Varianzanalyse mit Messwiederholungen (Repeated measures analysis of variance; RM ANOVA) unterzogen.

Dabei wurde die Greenhouse- Geisser Korrektur bei ungleichen Varianzen angewandt. Betrachtet wurden die Variablen Applikation und Zeit. P- Werte $< 0,05$ wurden als signifikant angesehen.

Die Varianzanalyse wurde für jede der Auswertungsphasen (akute Phase, Arousalphase und circadianer Biorhythmus) durchgeführt. Bei dem circadianen Biorhythmus wurde die Varianzanalyse routinemäßig am Tag vor der Manipulation (Tag -1) und am Tag der Manipulation (Tag 0) durchgeführt. Konnten Signifikanzen an Tag 0 aufgezeigt werden, so erfolgte eine weitere Varianzanalyse für die Tage 1 und 2.

Die Untersuchungsergebnisse der Corticosteronbestimmung wurden durch einen Student T-Test analysiert. Von Relevanz waren Signifikanzen im T- Test von p- Werte $< 0,05$.

4 Ergebnisse

4.1 Experimentelles Design

Weibliche Mäuse der Stämme C57BL/ 6J, BALB/ c und NMRI wurden in Versuchsgruppe und Kontrollgruppe eingeteilt. Bei der Versuchsgruppe wurden die subkutane, intraperitoneale, intravenöse und intraplantare Injektion und die Schlundsondierung mit den entsprechenden Fixierungstechniken durchgeführt. Die Kontrollgruppe wurde der Fixierung ohne Injektion unterzogen.

Um das mögliche Belastungspotential der unterschiedlichen Applikationsmethoden so genau wie möglich erfassen zu können, erfolgte eine kontinuierliche Messung der Parameter Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität über einen Zeitraum von vier Tagen. Diese Zeitspanne beinhaltete den Tag vor der Manipulation (Tag -1), den Tag, an dem die Manipulation stattgefunden hat (Tag 0), und sowohl den ersten Tag (Tag 1) also auch den zweiten Tag (Tag 2) nach der Applikation oder der entsprechenden Fixierungstechnik. Die Messung dieses Zeitintervalls wurde im Laufe unserer Studie als relevantes Zeitfenster für die Belastungseinschätzung apparent. Alle Parameter wurden in Intervallen von zehn Sekunden aufgezeichnet, was der maximalen Auflösung des DSI Messgerätes entspricht. Diese Daten wurden anschließend zum Teil weiter zusammengefasst, um größere Zeitintervalle analysieren zu können.

Akute Phase

In dieser Studie verfolgten wir die Annahme, dass die Applikationen eine akute Schmerzreaktion auslösen können, was sich auf kardiovaskulärer Ebene widerspiegeln sollte. Um diese Annahme zu verifizieren, wurde für den Parameter Herzfrequenz der Zeitraum von 300 Sekunden vor der Manipulation bis 300 Sekunden danach analysiert. Dabei wurden die Werte in einem Abstand von zehn Sekunden dargestellt, es fand also keine weitere Zusammenfassung der Werte statt.

Arousalphase

Unsere Versuche fanden in der Tagperiode, also in der Inaktivitätsphase der nicht aktiven Mäuse, statt. Dieses Vorgehen spiegelt den üblichen Labortieralltag wider. Manipulationen an Mäusen führen zu charakteristischen Erregungsreaktionen, die sich auf das kardiovaskuläre System (Herzfrequenz), den metabolen Stoffwechsel (Körpertemperatur) und auf Verhaltensmuster (Aktivität) auswirken. Vorangegangene Studien zeigten, dass diese Auswirkung ungefähr eine Stunde lang anhält bis die genannten Parameter auf ihre Ausgangswerte

zurückkehren (Arras et al., 2007a, Cinelli et al., 2007). Diese Reaktion wird als Arousalphase bezeichnet. Die Arousalreaktion zeigt die einzelnen Parameter in der Zeitspanne von 60 Minuten vor bis 60 Minuten nach der Manipulation. Dazu wurden die von der Telemetrieanlage alle zehn Sekunden aufgezeichneten Werte als fünf- Minuten- Mittelwerte zusammengefasst. Bei der retrobulbären Injektion wurde die Analyse der Arousalreaktion verlängert und die Zeitspanne von 60 Minuten vor bis 120 Minuten nach der Manipulation betrachtet.

Circadianer Biorhythmus

Um zu erkennen, ob die Applikations- und Fixierungstechniken das Potential haben den circadianen Rhythmus von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität zu beeinflussen wurde ein Zeitraum über vier Tage betrachtet. Im Detail wird der Tag vor der Manipulation (Tag -1), der Tag der Manipulation (Tag 0) sowie der erste und zweite Tag (Tag 1 und Tag 2) dargestellt. Dazu werden die von der Telemetrieanlage alle zehn Sekunden ausgegebenen Werte für jeden Parameter stundenweise zusammengefasst.

Da die Tiere mehrfach für Messungen eingesetzt wurden, konnten aufgrund der Batterielebensdauer der Transponder nicht bei allen Versuchen die entsprechenden vier Tage komplett aufgezeichnet werden.

Für jeden dieser beschriebenen Zeitintervalle (akute Phase, Arousalphase und circadianer Biorhythmus) wurden die Parameter Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität für die Versuchsgruppe und die Kontrollgruppe jeweils separat für die Zeitspanne vor der Manipulation und für die Zeitspanne nach der Manipulation mittels RM ANOVA verglichen. In dieser Varianzanalyse werden sowohl der Effekt der Applikationstechnik als auch der Effekt der Zeit berücksichtigt. Zeitspezifische Signifikanzen (p (T)) werden nicht aufgezeigt, da in dieser Studie der mögliche Belastungseffekt der Applikationstechniken im Vordergrund steht.

Die Berücksichtigung der Zeitspanne vor der Manipulation soll als Verlaufskontrolle (Longitudinal- Beurteilung) dienen. Damit soll untersucht werden, dass sich die Versuchs- und Kontrollgruppen nicht schon vor der Manipulation signifikant unterscheiden.

Bei der Analyse des circadianen Biorhythmus haben wir zunächst die Daten von Tag -1 und Tag 0 statistisch verglichen. Die Daten der Tage 1 und 2 wurden nur dann analysiert, wenn Signifikanzen zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe an Tag 0 sichtbar waren.

Darstellung der Ergebnisse

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch das Programm Microsoft Excel 2010 und SigmaPlot Version 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland).

Die dargestellten Punkte sind die entsprechenden Mittelwerte aller Mäuse einer Gruppe und eines Stammes zu dem angezeigten Zeitpunkt. Der Zeitpunkt der jeweiligen Manipulation ist in den Abbildungen durch eine blaue Linie gekennzeichnet.

Die Standardfehler (SEM) sind als Fehlerbalken oberhalb und unterhalb der Graphen in den Abbildungen wiedergegeben.

4.2 Ergebnisse der unterschiedlichen Applikationsmethoden

4.2.1 Ergebnisse in der akuten Phase

Die dargestellten Kurven in den Abbildungen 16, 17 und 18 zeigen den kardiovaskulären Verlauf von weiblichen C57BL/ 6J, BALB/ c und NMRI Mäusen für die *akute Phase* der subkutanen, intravenösen, intraperitonealen und intraplantaren Injektion sowie der Schlundsondierung und der entsprechenden Tiere der Kontrollgruppe, die der bloßen Fixierungstechnik ohne Injektion unterworfen wurden.

Bei allen untersuchten Mausstämmen und Injektionstechniken zeigt sich ein typischer Herzfrequenzverlauf mit einem sukzessiven Anstieg in den 300 Sekunden vor der Manipulation. Die Herzfrequenz erreicht direkt am Zeitpunkt oder in unmittelbarer Nähe des Zeitpunktes der Injektion bzw. der Schlundsondierung bzw. in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der bloßen Fixierung (blaue Linie) die höchsten Werte. Die Werte bleiben über die gesamten 300 Sekunden nach der Manipulation annähernd auf dem Niveau, das zum Zeitpunkt der Injektion erreicht wurde. Bei der intravenösen Injektion von C57BL/ 6J und BALB/ c Mäusen zeigt die Varianzanalyse mittels RM ANOVA einen von der Applikationstechnik (p (A)) und einen von der Applikationstechnik und Zeit abhängigen (p (A*T)) signifikanten Unterschied des Herzfrequenz Parameters zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe in den 300 Sekunden vor der Manipulation (Abbildung 16 B und 17 B, Tabelle 10). Bei beiden Mausstämmen ist dieser signifikante Unterschied der Herzfrequenz in der Zeit nach der Manipulation nicht mehr vorhanden. Darüber hinaus ergeben sich keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren vor der Durchführung der Applikation.

In den ersten 300 Sekunden nach der Injektion zeigen sich für alle Techniken und Stämme keine signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren (Abbildungen 16 B-E, 17, 18, Tabelle 10). Lediglich bei der subkutanen Injektion von C57BL/ 6J Mäusen tritt eine applikations- und zeitabhängige post- prozedurale Signifikanz auf (Abbildung 16 A, Tabelle 10).

Obwohl die Reaktion der Herzfrequenz auf die durchgeführten Applikationstechniken und auf die Fixierungstechniken bei allen drei Mausstämmen prinzipiell einen ähnlichen Trend zeigt, so erkennt man doch einige eindeutige stammesabhängige Unterschiede. Diese zeigen sich in der Höhe der maximal erreichten Herzfrequenz und in der Stringenz des Anhaltens der kardialen Reaktion. Zudem ist ein stammesabhängiger Unterschied bei der interindividuellen Schwankung der Herzfrequenz in den 300 Sekunden nach den Eingriffen erkennbar.

Bereits die Basiswerte bei den BALB/ c Mäusen mit Werten von ca. 500 Schlägen pro Minute (siehe Abbildung 17) liegen unter den Basiswerten von C57BL/6J (siehe Abbildung 16) und NMRI (siehe Abbildung 18) Mäusen mit ca. 650 Schlägen pro Minute. Die durch die Manipulation induzierten Maximalwerte der Herzfrequenz sind bei den BALB/ c Mäusen mit ca. 690 Schlägen pro Minute (siehe Abbildung 17) niedriger als bei den beiden anderen Stämmen (siehe Abbildungen 16, 18), bei denen die Herzfrequenz ein Maximum von ca. 750 bis 800 Schlägen pro Minute erreicht.

Auffallend ist, dass die erreichten Maximalwerte sowohl in der Versuchsgruppe als auch in der Kontrollgruppe relativ stabil über die gesamten 300 Sekunden nach der Manipulation aufrechterhalten werden. Der Effekt ist aber besonders bei der subkutanen, intravenösen, intraperitonealen und intraplantaren Injektionen von C57BL/ 6J (siehe Abbildung 16 A- D) und NMRI (siehe Abbildung 18) Mäusen erkennbar. Bei der Schlundsondierung von Mäusen des Stammes C57BL/ 6J ist das Phänomen sowohl in der Versuchsgruppe als auch in der Kontrollgruppe etwas weniger ausgeprägt als bei den anderen Techniken bei diesem Stamm beobachtet (siehe Abbildung 16 E).

Die C57BL/ 6J Herzfrequenz weist bei allen untersuchten Techniken extrem reduzierte SEM Werte in den 300 Sekunden nach der Manipulation auf (siehe Abbildung 16). Dieses Ergebnis zeigt sich ähnlich, aber weniger ausgeprägt bei den NMRI Mäusen (siehe Abbildung 18). Im Gegensatz dazu zeigen die BALB/ c Mäuse bei den gleichen Injektionstechniken und Fixierungstechniken eine höhere interindividuelle Schwankung der Herzfrequenz in den 300 Sekunden nach der Manipulation mit einem stärkeren Trend zur Normalisierung der Herzfrequenz am Ende der akuten Phase (siehe Abbildung 17).

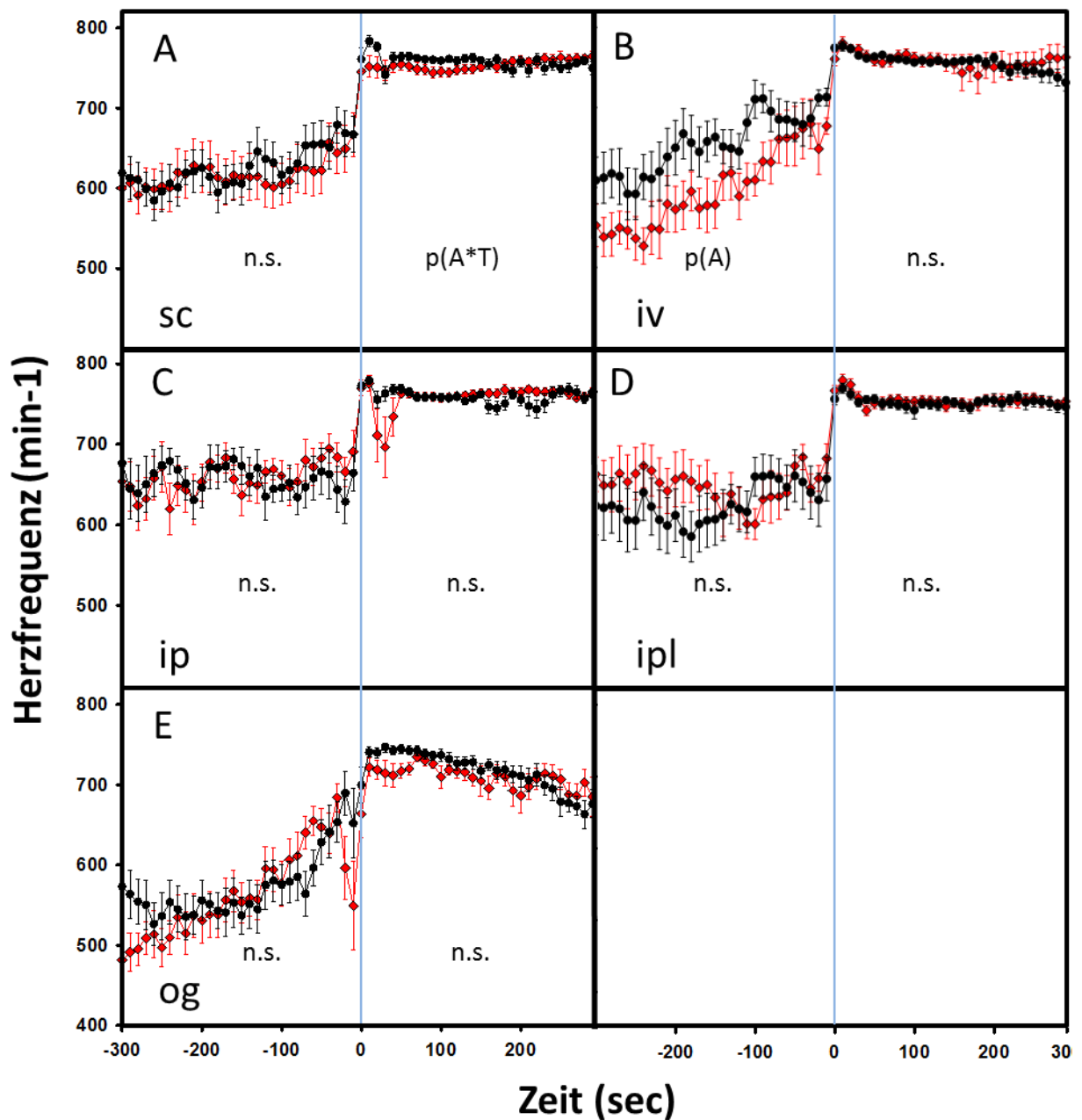


Abbildung 16: Akute Phase von C57BL/ 6J Mäusen (sc, iv, ip, ipl, og).

Akute Phase der telemetrischen Messungen des Parameters Herzfrequenz bei C57BL/ 6J Mäusen bei der subkutanen (A, sc), intravenösen (B, iv), intraperitonealen (C, ip) und intraplantaren (D, ipl) Injektion und bei der Schlundsondierung (E, oral gavage= og) (rote Graphen) und bei den entsprechenden Fixierungstechniken (schwarze Graphen). Die blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Injektion oder reinen Fixierung dar. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. Das Zeichen p (A) bezeichnet applikationstechnikabhängige Signifikanzen, das Zeichen p (A*T) bezeichnet applikations- und zeitabhängige Signifikanzen und n.s. bezeichnet nicht signifikante Ergebnisse

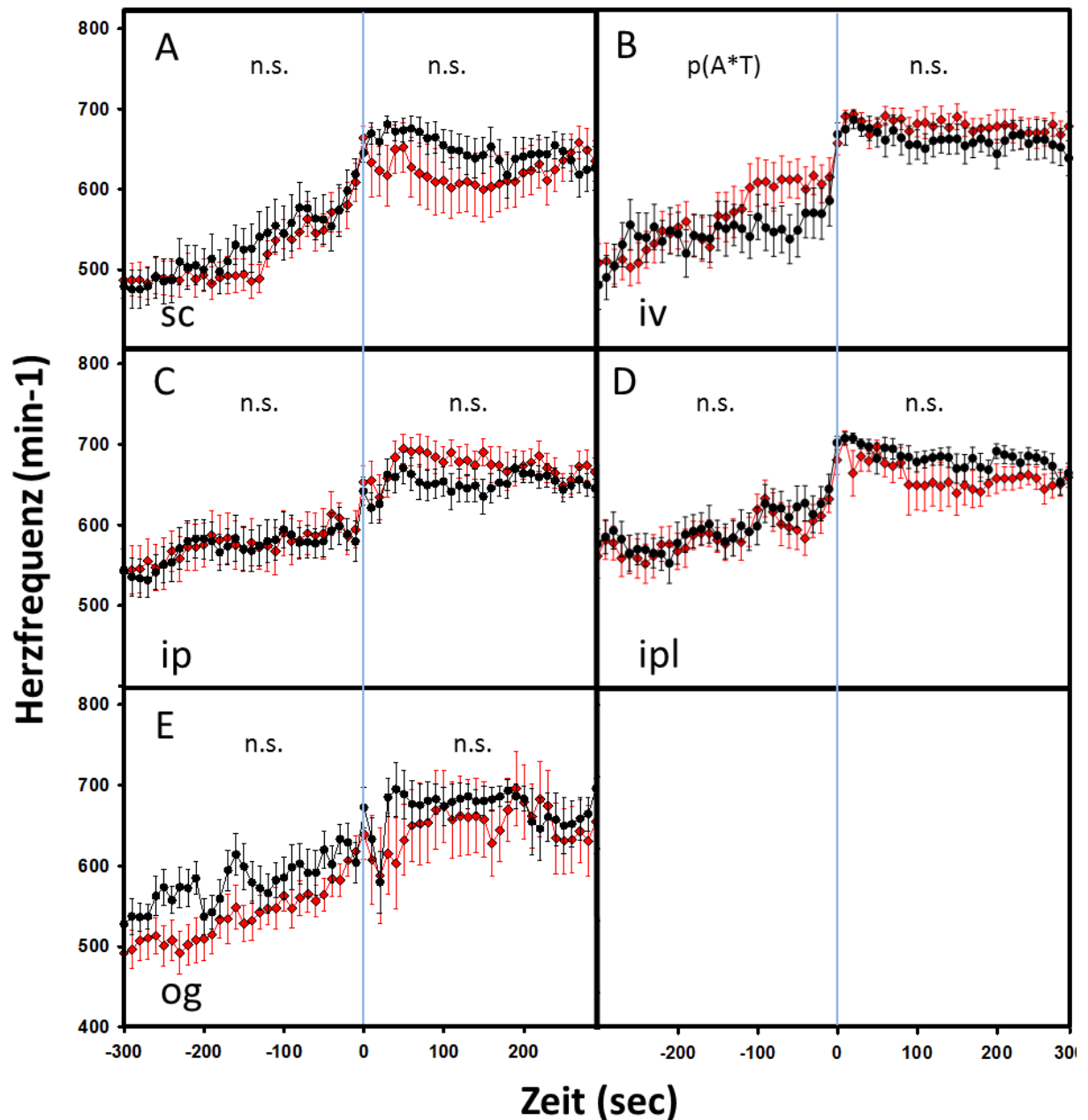


Abbildung 17: Akute Phase von BALB/c Mäusen (sc, iv, ip, ipl, og).

Akute Phase der telemetrischen Messungen des Parameters Herzfrequenz bei BALB/c Mäusen bei der subkutanen (A, sc), intravenösen (B, iv), intraperitonealen (C, ip) und intraplantaren (D, ipl) Injektion und bei der Schlundsondierung (E, orale gavage=og) (rote Graphen) und bei den entsprechenden Fixierungstechniken (schwarze Graphen). Die blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Injektion oder reinen Fixierung dar. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. Das Zeichen p (A*T) bezeichnet applikations- und zeitabhängige Signifikanzen und n.s. bezeichnet nicht signifikante Ergebnisse

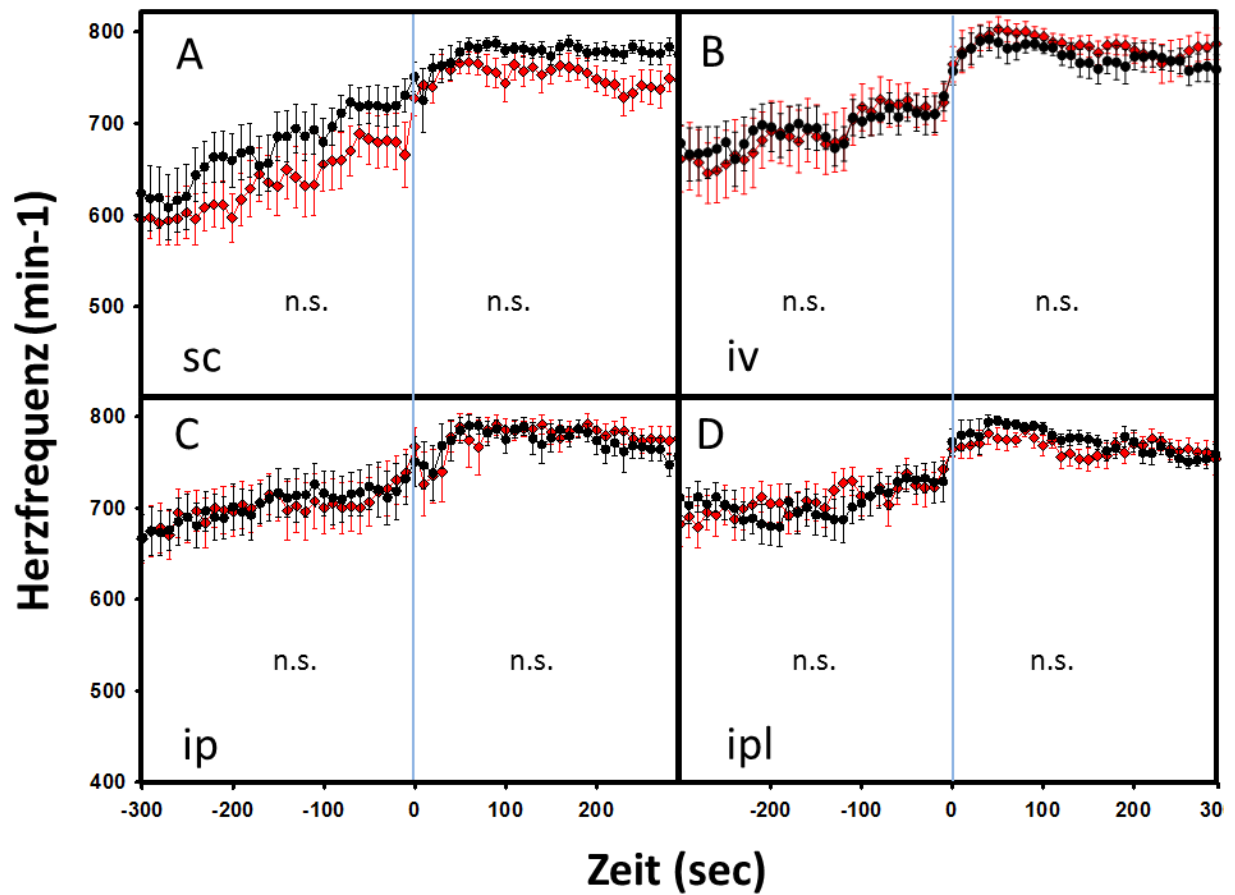


Abbildung 18: Akute Phase von NMRI Mäusen (sc, iv, ip, ipl).

Akute Phase der telemetrischen Messungen des Parameters Herzfrequenz bei NMRI Mäusen bei der subkutanen (A, sc), intravenösen (B, iv), intraperitonealen (C, ip) und intraplantaren (D, ipl) Injektion (rote Graphen) und bei den entsprechenden Fixierungstechniken (schwarze Graphen). Die blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Injektion oder reinen Fixierung dar. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate

Die beschriebenen Stammesunterschiede zeigten sich in der Analyse mittels RM ANOVA als signifikant und sind in Tabelle 9 zusammenfassend beschrieben. Die Herzfrequenzwerte von C57BL/ 6J, BALB/ c und NMRI Mäusen der Kontrollgruppen wurden mittels RM ANOVA für die 300 Sekunden nach der Manipulation verglichen. Es konnte keine applikationstechnik- und zeitabhängigen spezifischen Signifikanzen zwischen den verschiedenen Stämmen nachgewiesen werden. Allerdings zeigen sich für alle angewandten Fixierungstechniken applikationstechnikabhängige Signifikanzen ($p(A)$) zwischen den Stämmen BALB/ c und C57BL/ 6J sowie zwischen den Stämmen BALB/ c und NMRI. Diese signifikanten Unterschiede konnten nicht zwischen den Stämmen C57BL/ 6J und NMRI nachgewiesen werden (n.s. = nicht signifikant).

Tabelle 9: Stammspezifische Unterschiede der Herzfrequenz in der Zeitspanne nach der Manipulation in der akuten Phase.

	BALB/ c versus C57BL/ 6J	C57BL/ 6J versus NMRI	BALB/ c versus NMRI
sc Kontrolle	p (A)	n.s.	p (A)
iv Kontrolle	p (A)	n.s.	p (A)
ip Kontrolle	p (A)	n.s.	p (A)
ipl Kontrolle	p (A)	n.s.	p (A)

4.2.2 Ergebnisse in der Arousalphase

Abbildungen 19, 21 und 23 zeigen die Verläufe von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität von C57BL/ 6J, BALB/ c und NMRI Mäusen, die subkutan, intravenös, intraperitoneal und intraplantar injiziert wurden für die Arousalphase. Die Schlundsondierung wurde nur bei C57BL/ 6J und BALB/ c Mäusen untersucht und die Ergebnisse sind in den Abbildungen 20 und 22 dargestellt. Wie bereits beschrieben wurden dazu die während der inaktiven Lichtperiode aufgezeichneten Daten in der Zeitspanne von 60 Minuten vor der Manipulation bis 60 Minuten danach betrachtet. Die von DSI ausgegebenen Werte wurden dazu zu fünf-Minuten Werten zusammengefasst.

In den Abbildungen 19 bis 23 zeigen jeweils der obere Graph den Verlauf der Herzfrequenz, der mittlere Graph den Verlauf der Körpertemperatur und der untere Graph den Verlauf der Aktivität der Mäuse während der Zeitperiode der Arousalphase.

Die Reaktion von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität in der Arousalphase stellt sich prinzipiell für alle untersuchten Applikationsformen und Mausstämme ähnlich dar. Es zeigt sich für alle Parameter und für alle analysierten Applikationstechniken unmittelbar vor

der Manipulation ein abrupter Anstieg der Werte. Ungefähr am Zeitpunkt der Manipulation (blaue Linie), erreichen die Werte ein Maximum, um sich in der post-prozeduralen Phase sukzessive auf die Höhe der Ausgangswerte zu normalisieren. Bei allen Applikationstechniken fand diese Normalisierung innerhalb von ca. 60 Minuten statt.

In den 60 Minuten vor der Manipulation konnten von der Applikationstechnik (p (A)) oder Applikationstechnik und Zeit (p (A*T)) abhängige Signifikanzen für die Parameter Körpertemperatur und Aktivität von intravenös injizierten C57BL/ 6J Mäusen (siehe Abbildung 19 B, Tabelle 10), sowie für die Körpertemperatur bei der Schlundsondierung von C57BL/ 6J Mäusen (siehe Abbildung 20, Tabelle 10) und für die Körpertemperatur von intravenös injizierten NMRI Mäusen (siehe Abbildung 23 B, Tabelle 10) detektiert werden. Diese signifikanten Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe hielten jedoch nach dem Eingriff nicht an.

In den 60 Minuten nach der Manipulation zeigten sich von der Applikationstechnik (p (A)) oder Applikationstechnik und Zeit (p (A*T)) abhängige Signifikanzen für die Aktivität von intravenös injizierten BALB/ c Mäusen (siehe Abbildung 21 B, Tabelle 10) , für die Herzfrequenz von intravenös injizierten NMRI Mäusen (siehe Abbildung 23 B, Tabelle 10) und für die Körpertemperatur von intraperitoneal injizierten NMRI Mäusen (siehe Abbildung 23 C, Tabelle 10).

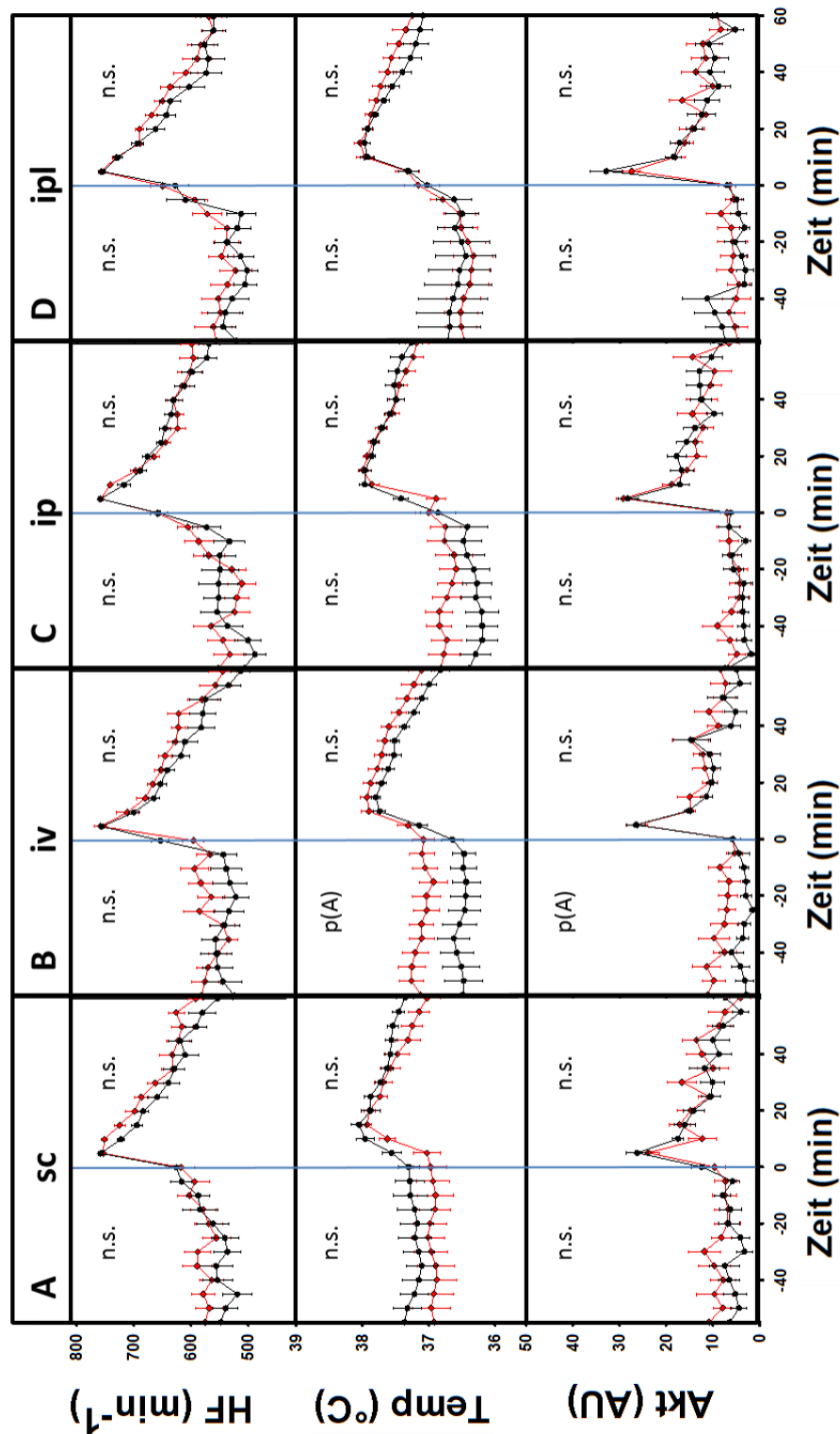


Abbildung 19 Arousalphase von C57BL/6J Mäusen (sc, iv, ip, ipl). Arousalphase der Herzfrequenz (oberer Graph), der Körpertemperatur (mittlerer Graph) und der Aktivität (unterer Graph) von C57BL/6J Mäusen bei subkutaner (A), intravenöser (B), intraperitonealer (C) und intraplantarer (D) Injektion (rote Graphen) bzw. bei den entsprechenden Fixierungstechniken (schwarze Graphen). Die blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Injektion bzw. der Fixierung dar. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. Signifikanzen sind durch p (A) (applikationstechnikabhängige Signifikanz) und n.s. (nicht signifikant) beschrieben

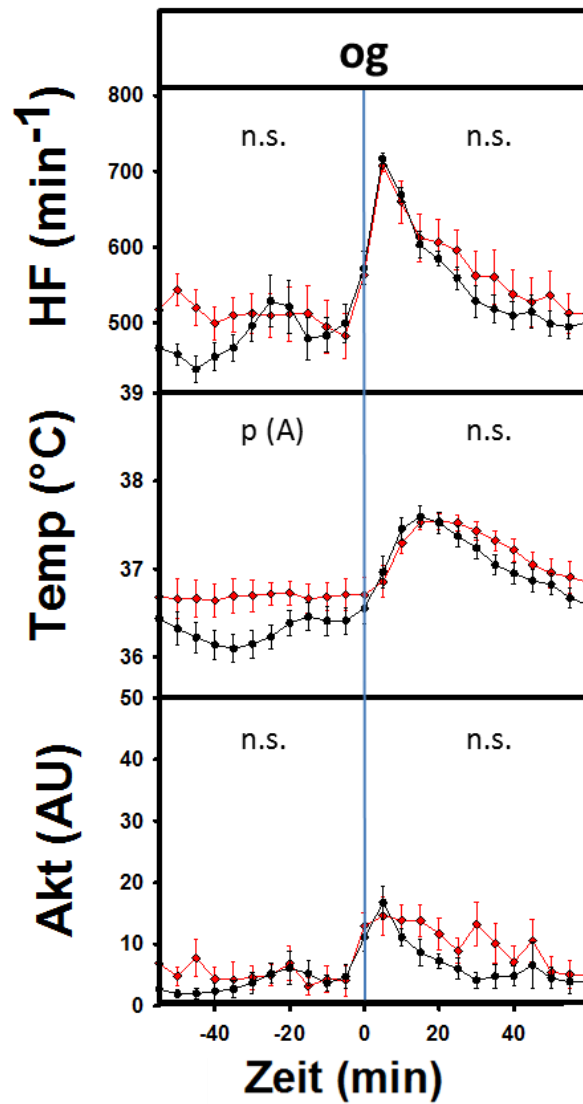


Abbildung 20: Arousalphase von C57BL/6J Mäusen (og).

Arousalphase der Herzfrequenz (oberer Graph), der Körpertemperatur (mittlerer Graph) und der Aktivität (unterer Graph) von C57BL/6J Mäusen bei der Schlundsondierung (rote Graphen) bzw. bei der entsprechenden Fixierungstechnik (schwarze Graphen). Die blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Injektion bzw. der Fixierung dar. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. Signifikanzen sind durch p (A) (applikationstechnische Signifikanz) und n.s. (nicht signifikant) beschrieben

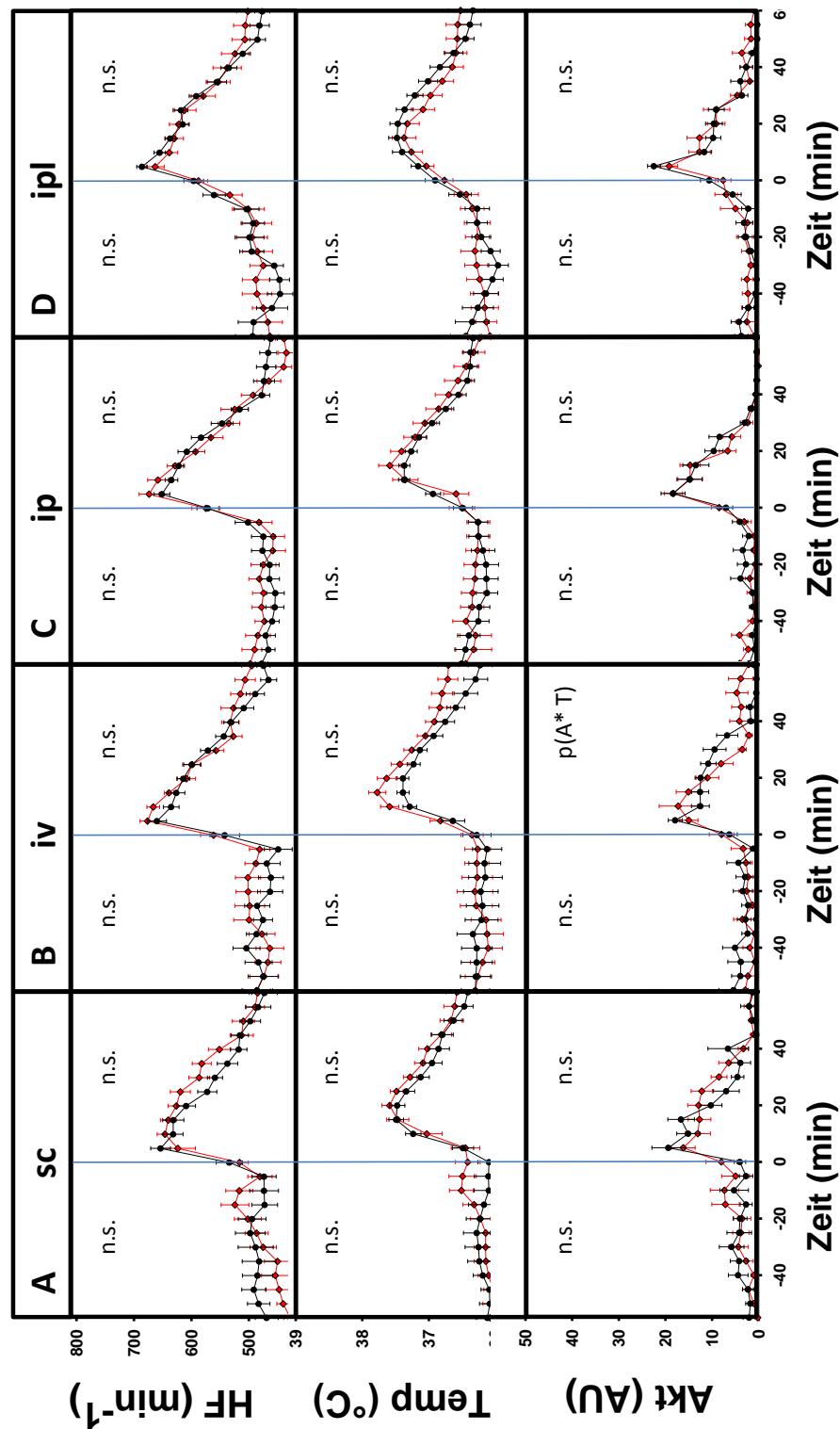


Abbildung 21: Arousalphase von BALB/ c Mäusen (sc, iv, ip, ipl).

Arousalphase der Herzfrequenz (oberer Graph), der Körpertemperatur (mittlerer Graph) und der Aktivität (unterer Graph) von BALB/ c Mäusen bei subkutaner (A), intravenöser (B), intraperitonealer (C) und intraplantarer (D) Injektion (rote Graphen) bzw. bei den entsprechenden Fixierungstechniken (schwarze Graphen). Die blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Injektion bzw. der Fixierung dar. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb der Werte dargestellt. Signifikanzen sind durch $p(A \cdot T)$ (applikations- und zeitabhängige Signifikanz und n.s. (nicht signifikant) beschrieben

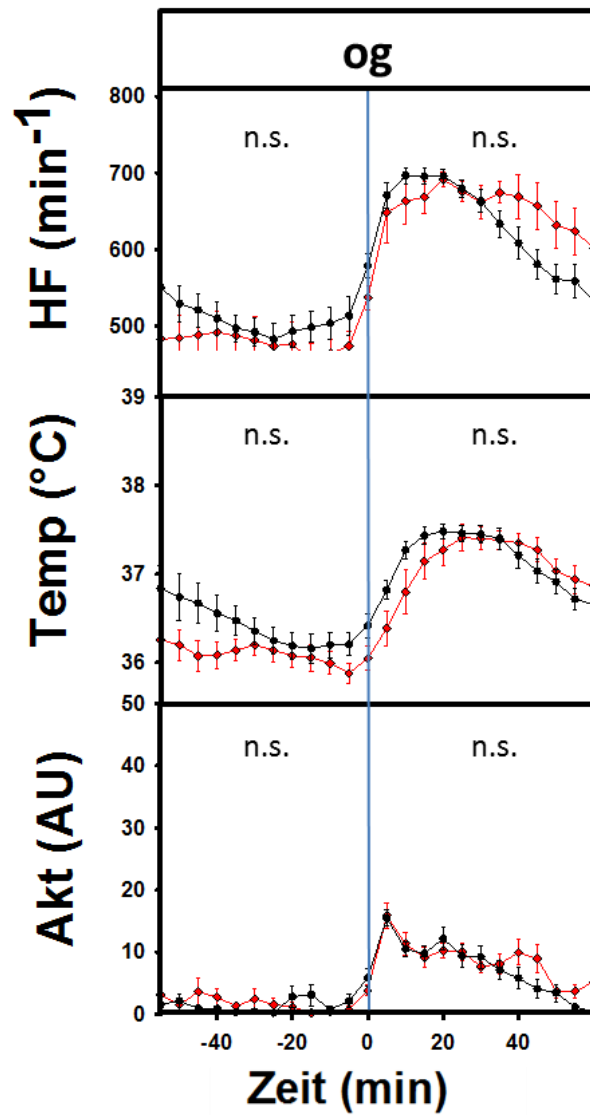


Abbildung 22: Arousalphase von BALB/c Mäusen (og).

Arousalphase der Herzfrequenz (oberer Graph), der Körpertemperatur (mittlerer Graph) und der Aktivität (unterer Graph) von BALB/c Mäusen bei der Schlundsondierung (rote Graphen) bzw. bei der entsprechenden Fixierungstechnik (schwarze Graphen). Die blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Injektion bzw. der Fixierung dar. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. Signifikanzen sind durch p (A) (applikationstechnische Signifikanz) und n.s. (nicht signifikant) beschrieben

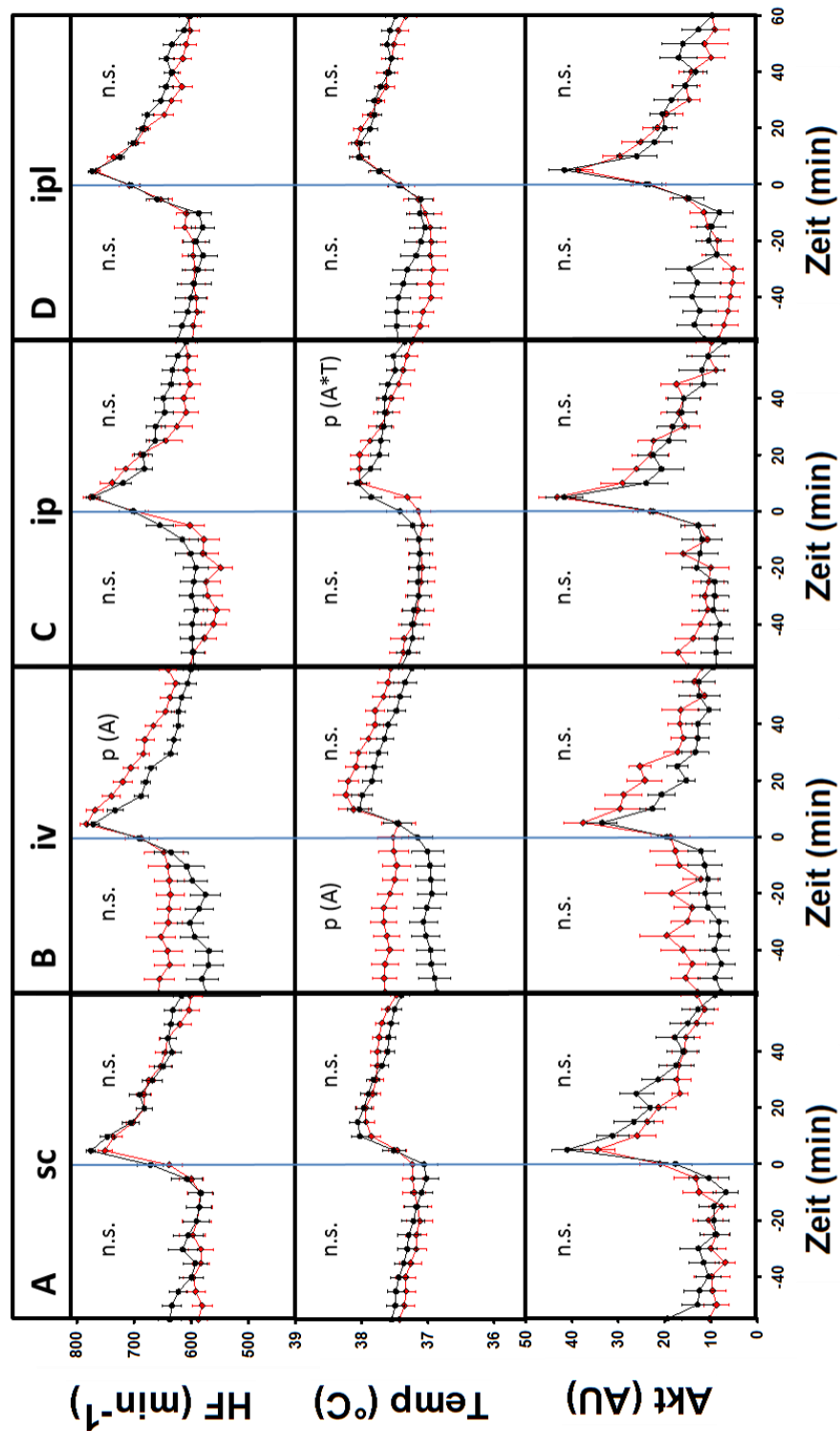


Abbildung 23: Arousalphase von NMRI Mäusen (sc, iv, ip, ipl).

Arousalphase der Herzfrequenz (oberer Graph), der Körpertemperatur (mittlerer Graph) und der Aktivität (unterer Graph) von NMRI Mäusen bei subkutaner (A), intravenöser (B), intraperitonealer (C) und intraplantarer (D) Injektion (rote Graphen) bzw. bei den entsprechenden Fixierungstechniken (schwarze Graphen). Die blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Injektion bzw. der reinen Fixierung dar. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. Signifikanzen sind durch p (A) (applikationstechnikabhängige Signifikanz), p (A*T) (applikations- und zeitabhängige Signifikanz und n.s. (nicht signifikant) beschrieben

4.2.3 Ergebnisse der circadianen Biorhythmen

Abbildungen 24 bis 37 zeigen den *circadianen Biorhythmus* der Mäuse einen Tag vor der Manipulation (Tag -1), am Tag der Manipulation (Tag 0) und an den beiden darauf folgenden Tagen (Tag 1 und 2). Hier wurden die Ausgangswerte der DSI Messanlage zu Mittelwerten von 60 Minuten zusammengefasst. Bei einigen NMRI Mäusen wurde die Messung nach einer Stunde bereits gestoppt, so dass hier keine Daten für den circadianen Biorhythmus erfasst werden konnten. Daher ist die Anzahl der Tiere bei diesem Stamm für diese Zeitperiode in der Datenanalyse reduziert gegenüber der Tieranzahl bei der akuten Phase und der Arousalphase (Tabelle 3, Werte in Klammern).

Die Messung wurde überwiegend an Tag -1 zu Beginn der Lichtperiode um 7.00 Uhr gestartet, da dieses den normalen Alltag der Maus widerspiegelt. Bei einigen Versuchen haben jedoch die Messungen an Tag -1 erst um 14 Uhr oder 16 Uhr angefangen. Hierdurch reduzieren sich die Messzeitpunkte bei einigen Fragestellungen.

Die Messwerte des Tages vor der Manipulation (Tag -1) und des Tages der Manipulation (Tag 0) wurden immer mittels Varianzanalyse analysiert. Wenn applikations- oder applikations- und zeitabhängige Signifikanzen am Tag der Manipulation (Tag 0) aufgetreten sind, so wurden auch Tag 1 und Tag 2 in der Varianzanalyse berücksichtigt.

Die Injektionen fanden an Tag 0 gegen ca. 8 Uhr statt.

Die Abbildungen 24 bis 37 zeigen die für Nagetiere charakteristische (Partch et al., 2014) starke Abhängigkeit von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) vom Hell- Dunkel- Rhythmus der Tiere.

Bei allen untersuchten Stämmen zeigen die Parameter Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität in der Inaktivitätsperiode (Tag) Minimumwerte auf, die sich in der Aktivitätsperiode (Nacht) deutlich erhöhen.

Dabei zeigen die Werte der Aktivitätsphase einen charakteristischen biphasische Verlauf. Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität zeigen einen ersten, ungefähr fünf Stunden langen Peak am Anfang und einen kürzeren Peak von ungefähr drei Stunden am Ende der Aktivitätsperiode. Die Peaks werden durch eine intermittierende Periode von niedrigen Werten unterbrochen.

Wie in Abbildung 29 aufgezeigt ist, konnte bei der subkutanen Injektion eine von der Applikationstechnik und der Zeit abhängige Signifikanz bei den Mäusen des Stammes BALB/ c am Tag vor der Manipulation (Tag -1) bei der Herzfrequenz in der RM ANOVA ermittelt werden. Diese Signifikanz war jedoch an Tag 0 nicht mehr detektierbar. Bei intraperitoneal injizierten NMRI Mäusen trat eine applikationstechnikspezifische Signifikanz zwischen Versuchs- und

Kontrollgruppe bei der Herzfrequenz am Tag der Manipulation (Tag 0) auf (siehe Abbildung 36). In diesem Fall wurde die RM ANOVA auch für die Tage 1 und 2 durchgeführt mit dem Ergebnis, dass hier keine Signifikanzen in der Varianzanalyse mehr erkennbar waren.

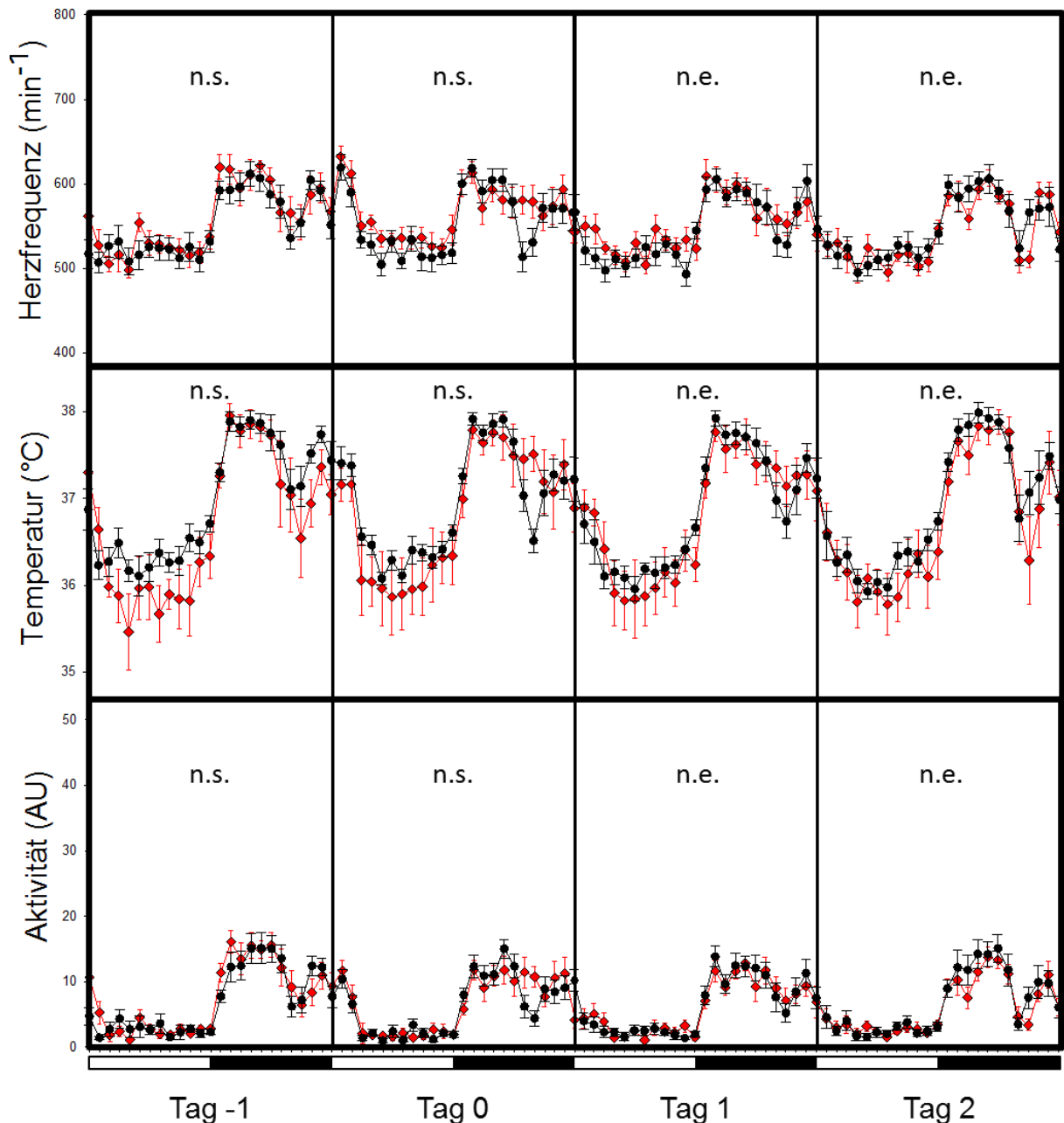


Abbildung 24: Circadianer Biorhythmus von C57BL/6J Mäusen (sc). Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von subkutan injizierten C57BL/6J Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt

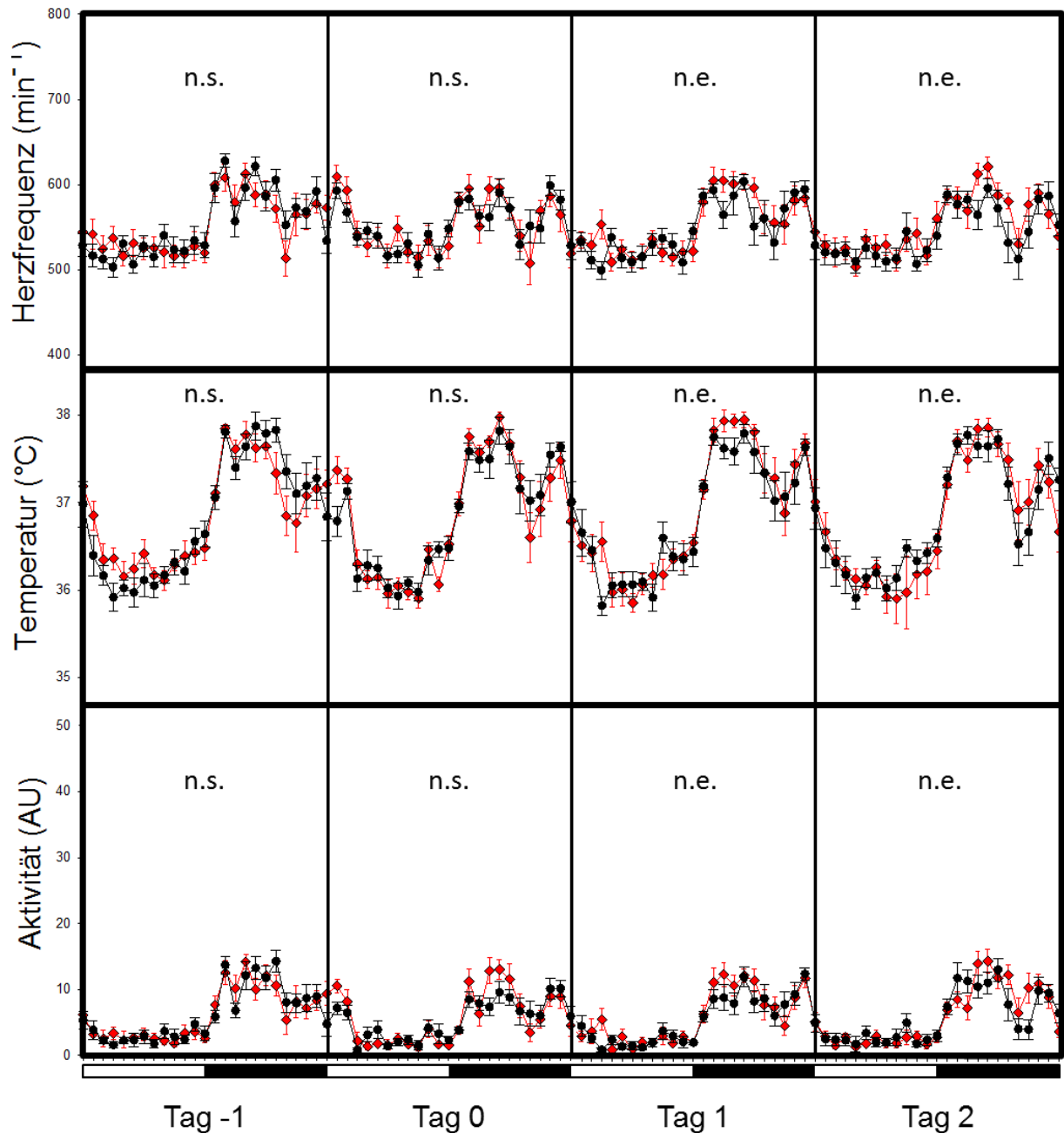


Abbildung 25: Circadianer Biorhythmus von C57BL/6J Mäusen (iv).

Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von intravenös injizierten C57BL/6J Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt.

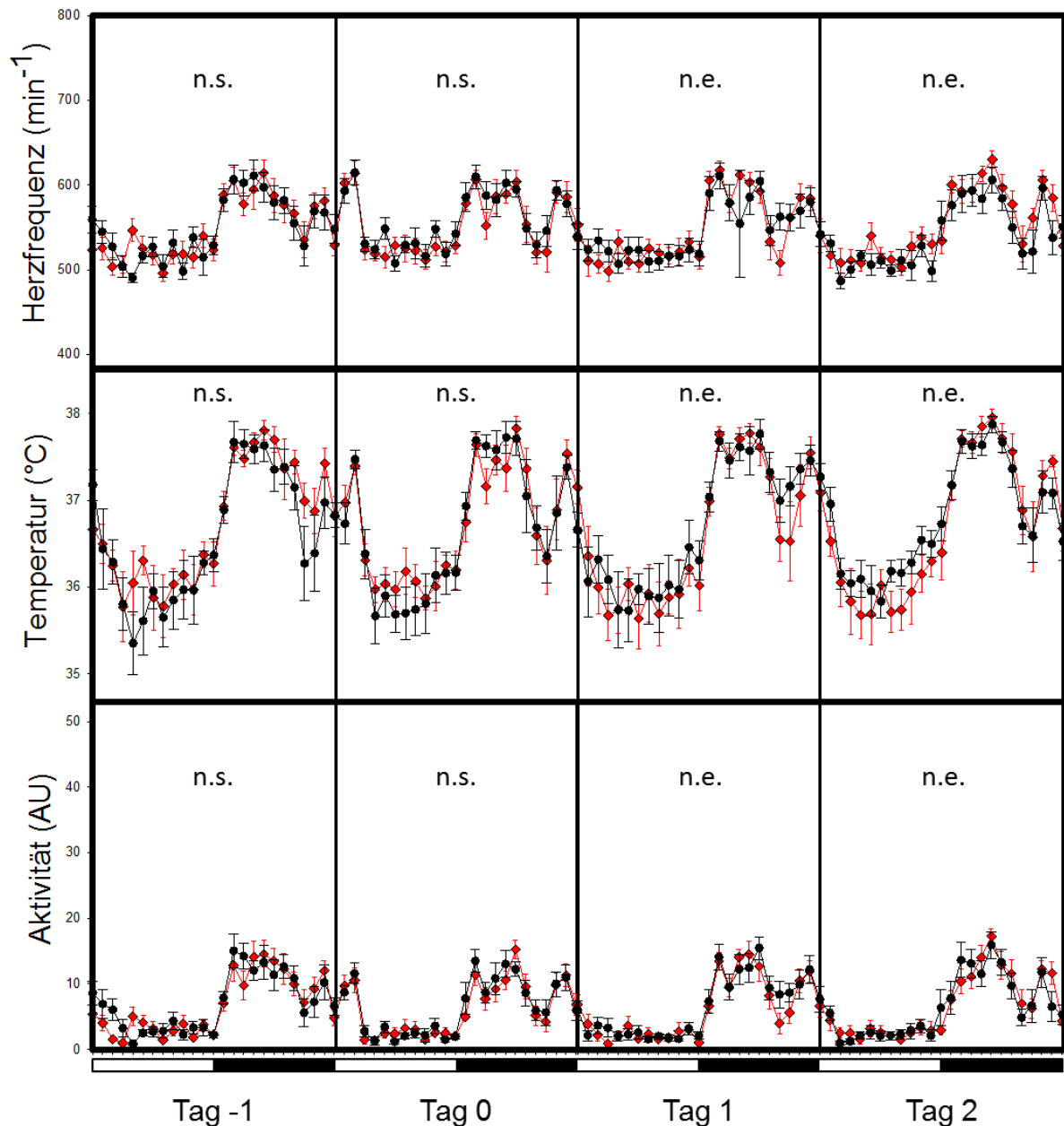


Abbildung 26: Circadianer Biorhythmus von C57BL/6J Mäusen (ip). Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von intraperitoneal injizierten C57BL/6J Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt

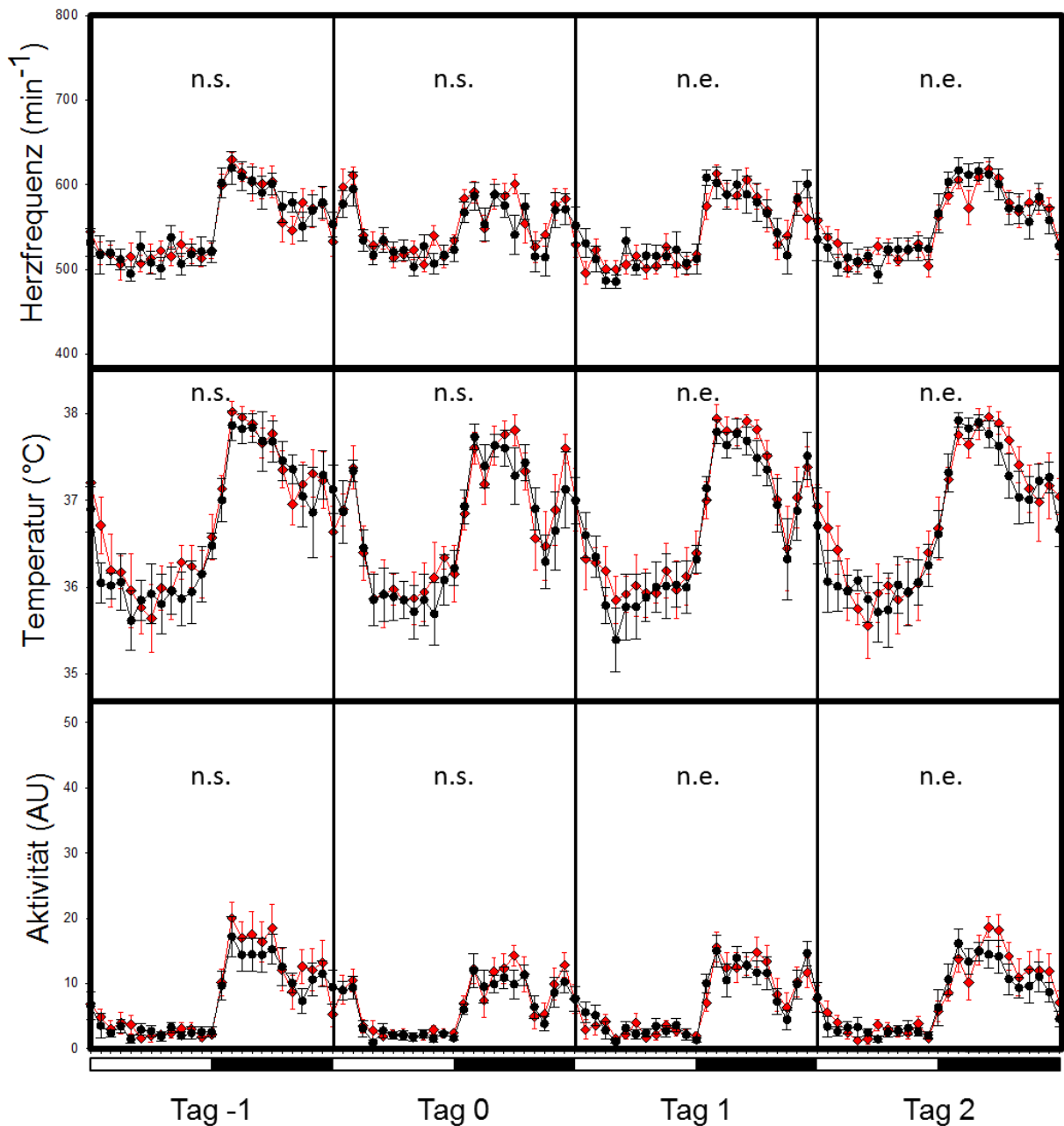


Abbildung 27: Circadianer Biorhythmus von C57BL/6J Mäusen (ipI).

Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von intraplantar injizierten C57BL/6J Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt

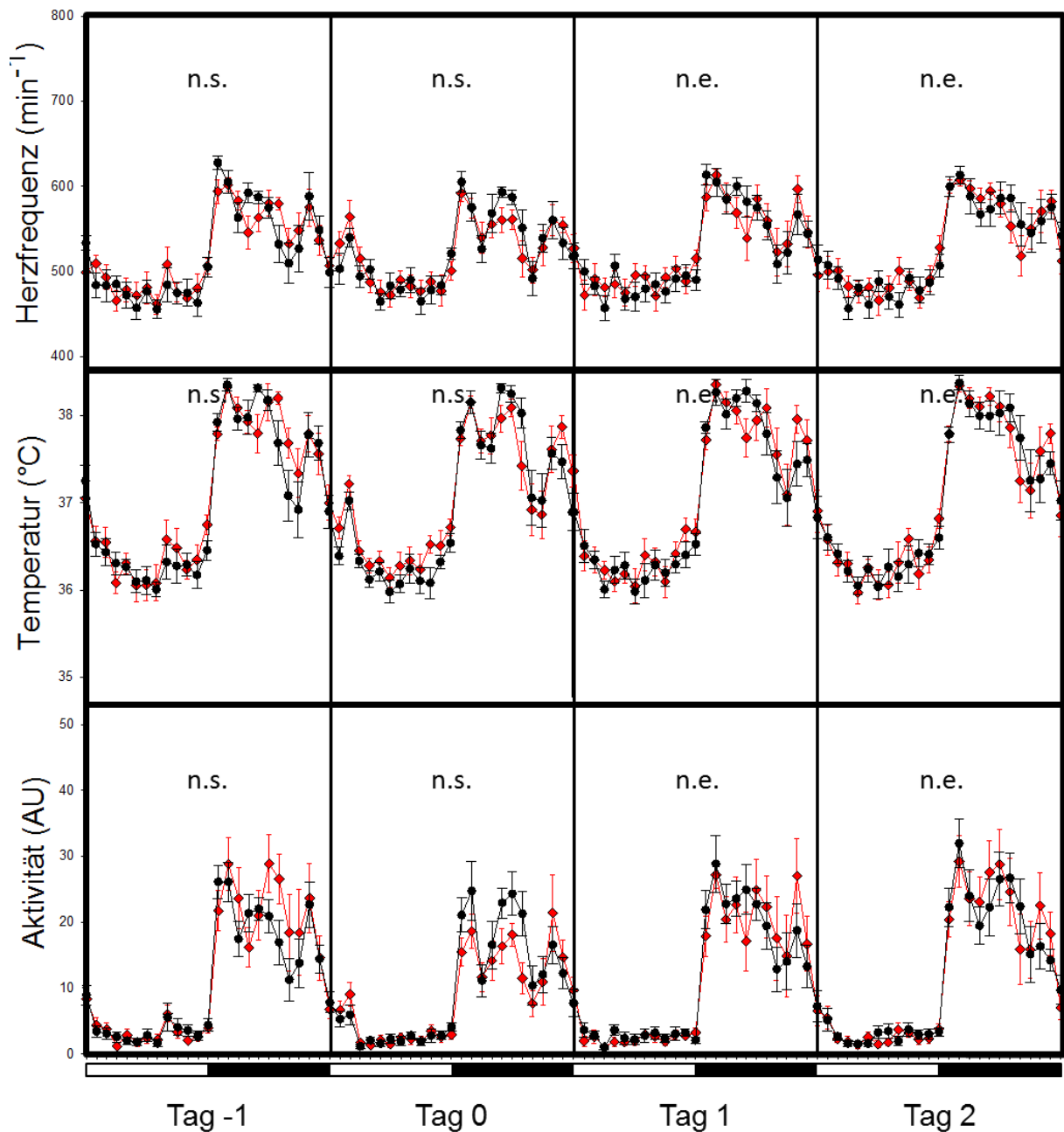


Abbildung 28: Circadianer Biorhythmus von C57BL/6J Mäusen (og).

Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von schlundsondierten C57BL/6J Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt.

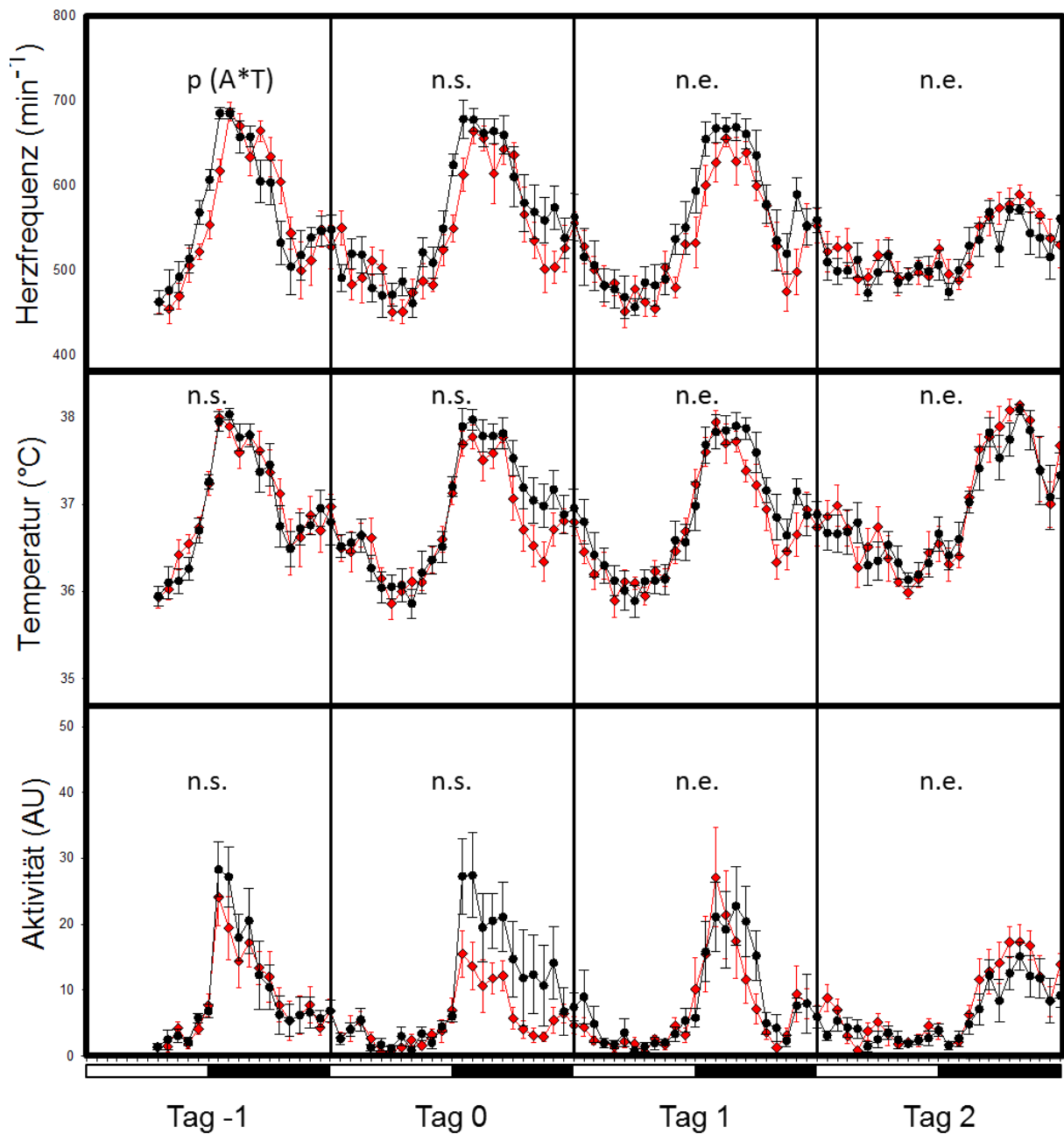


Abbildung 29: Circadianer Biorhythmus von BALB/ c Mäusen (sc).

Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von subkutan injizierten BALB/ c Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. P (A*T) beschreibt eine applikations- und zeitabhängige Signifikanz. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt

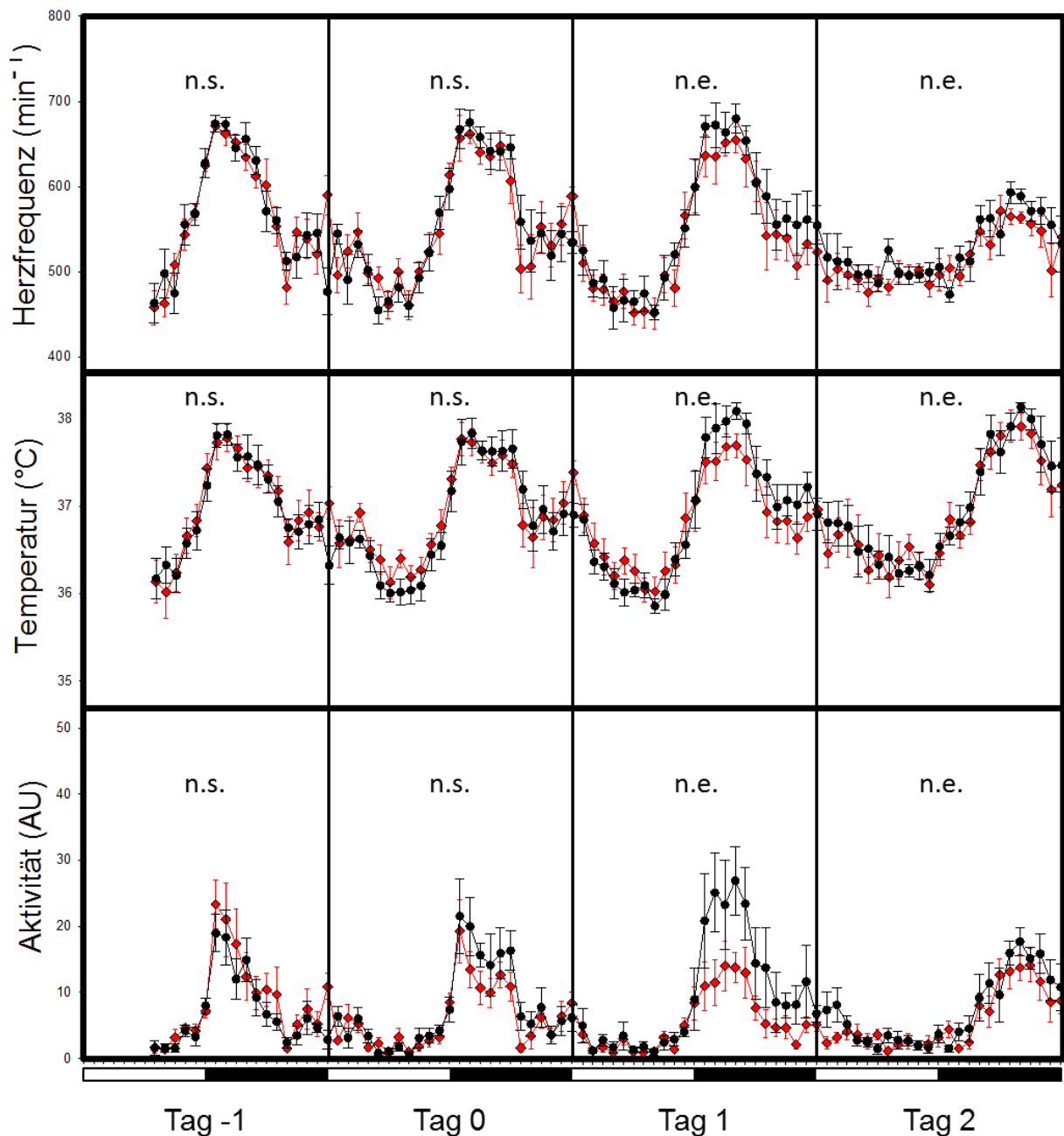


Abbildung 30: Circadianer Biorhythmus von BALB/ c Mäusen (iv). Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von intravenös injizierten BALB/ c Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt.

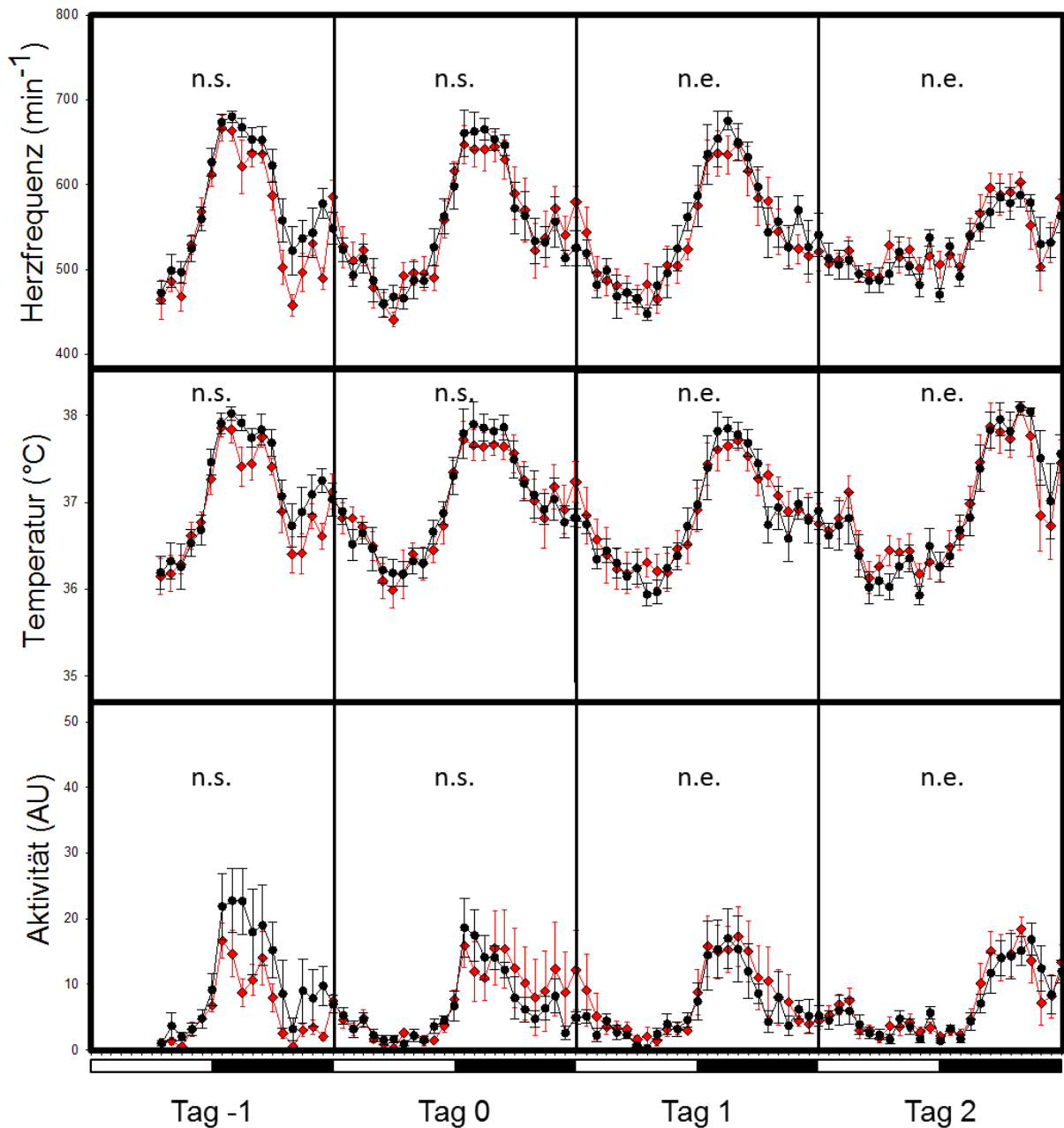


Abbildung 31: Circadianer Biorhythmus von BALB/ c Mäusen (ip). Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von intraperitoneal injizierten BALB/ c Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt.

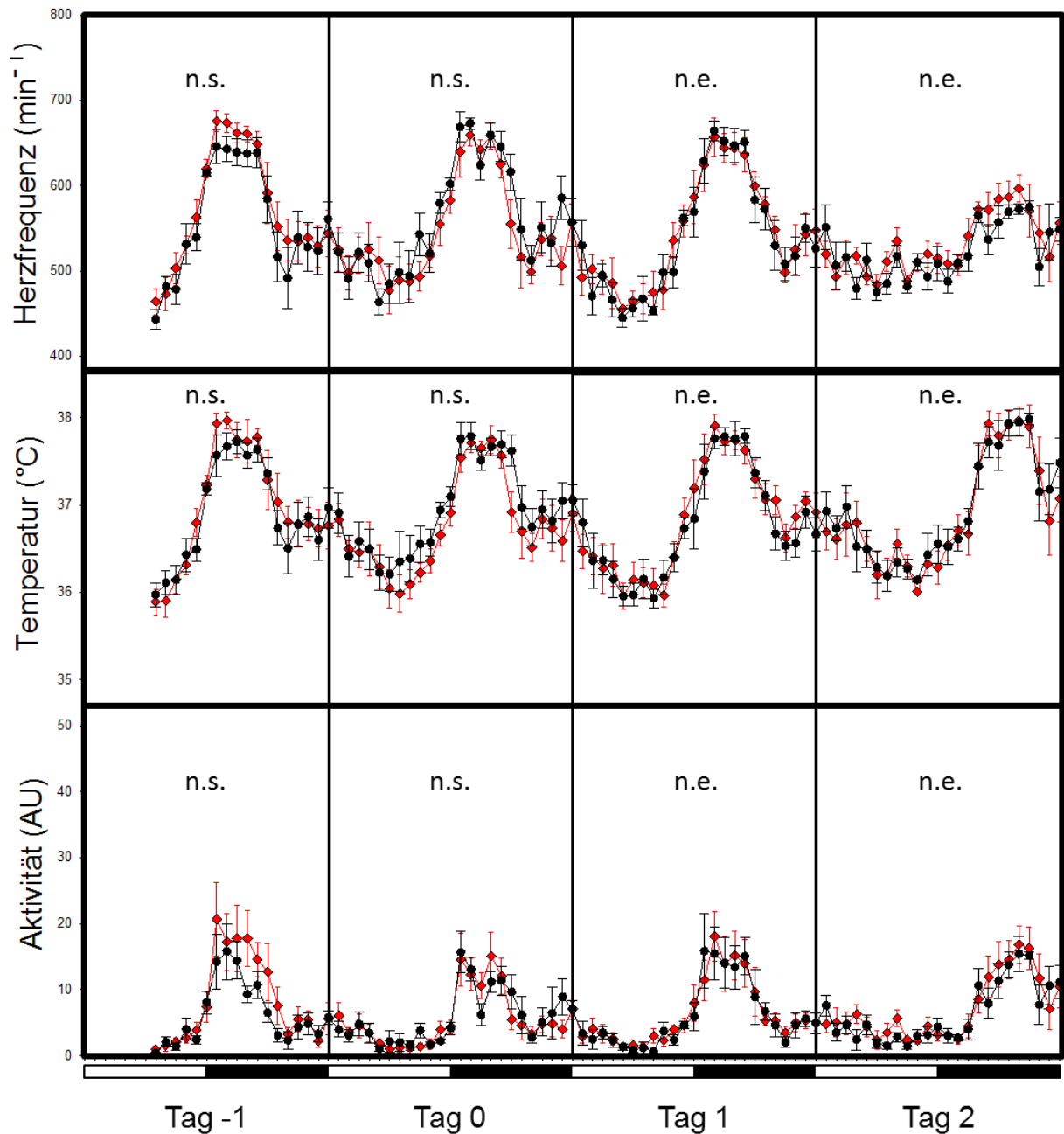


Abbildung 32: Circadianer Biorhythmus von BALB/c Mäusen (ipl).

Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von intraplantar injizierten BALB/c Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt.

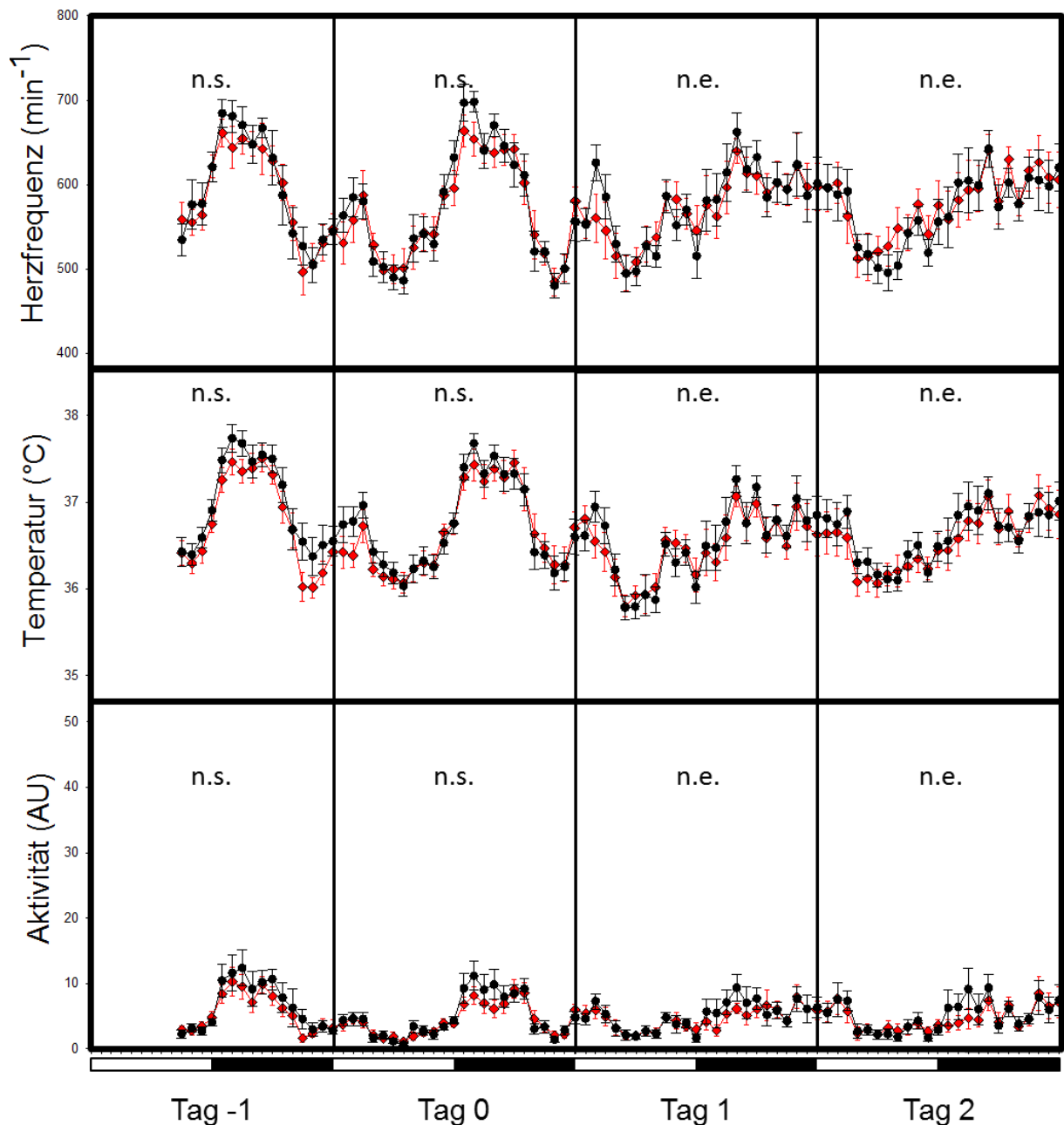


Abbildung 33: Circadianer Biorhythmus von BALB/ c Mäusen (og).

Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von schlundsondierten BALB/ c Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt.

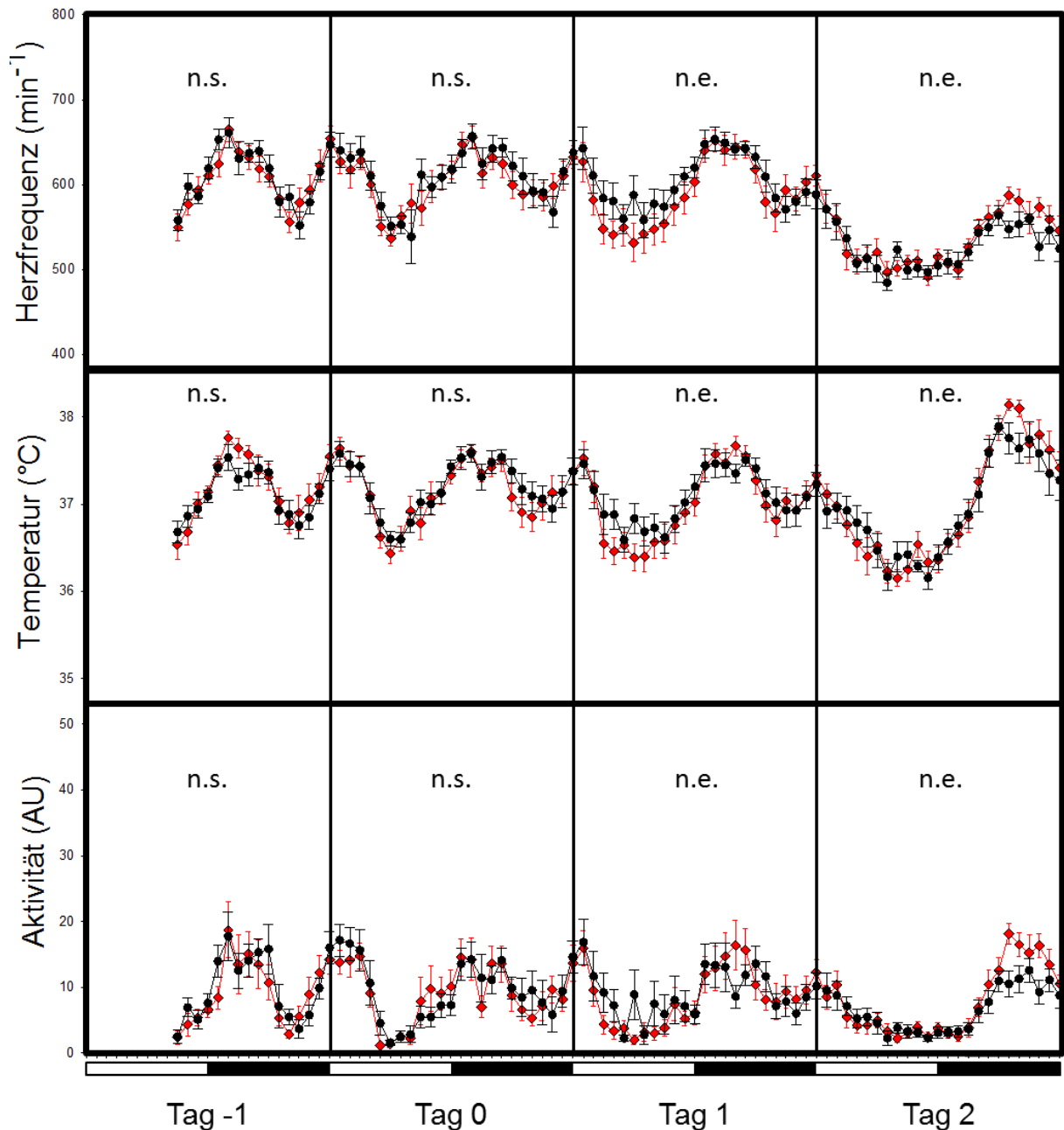


Abbildung 34: Circadianer Biorhythmus von NMRI Mäusen (sc). Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von subkutan injizierten NMRI Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt.

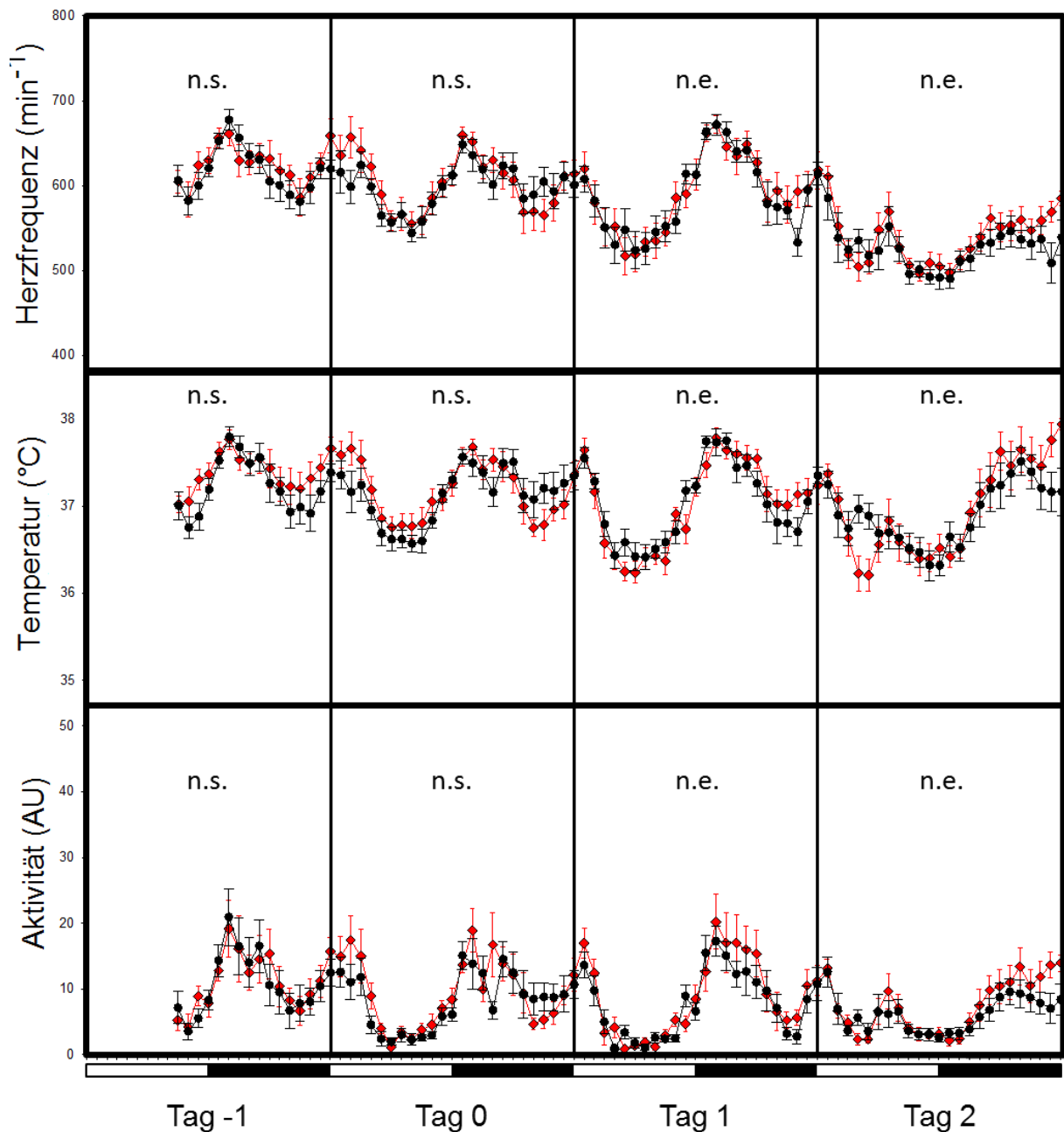


Abbildung 35: Circadianer Biorhythmus von NMRI Mäusen (iv). Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von intravenös injizierten NMRI Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt

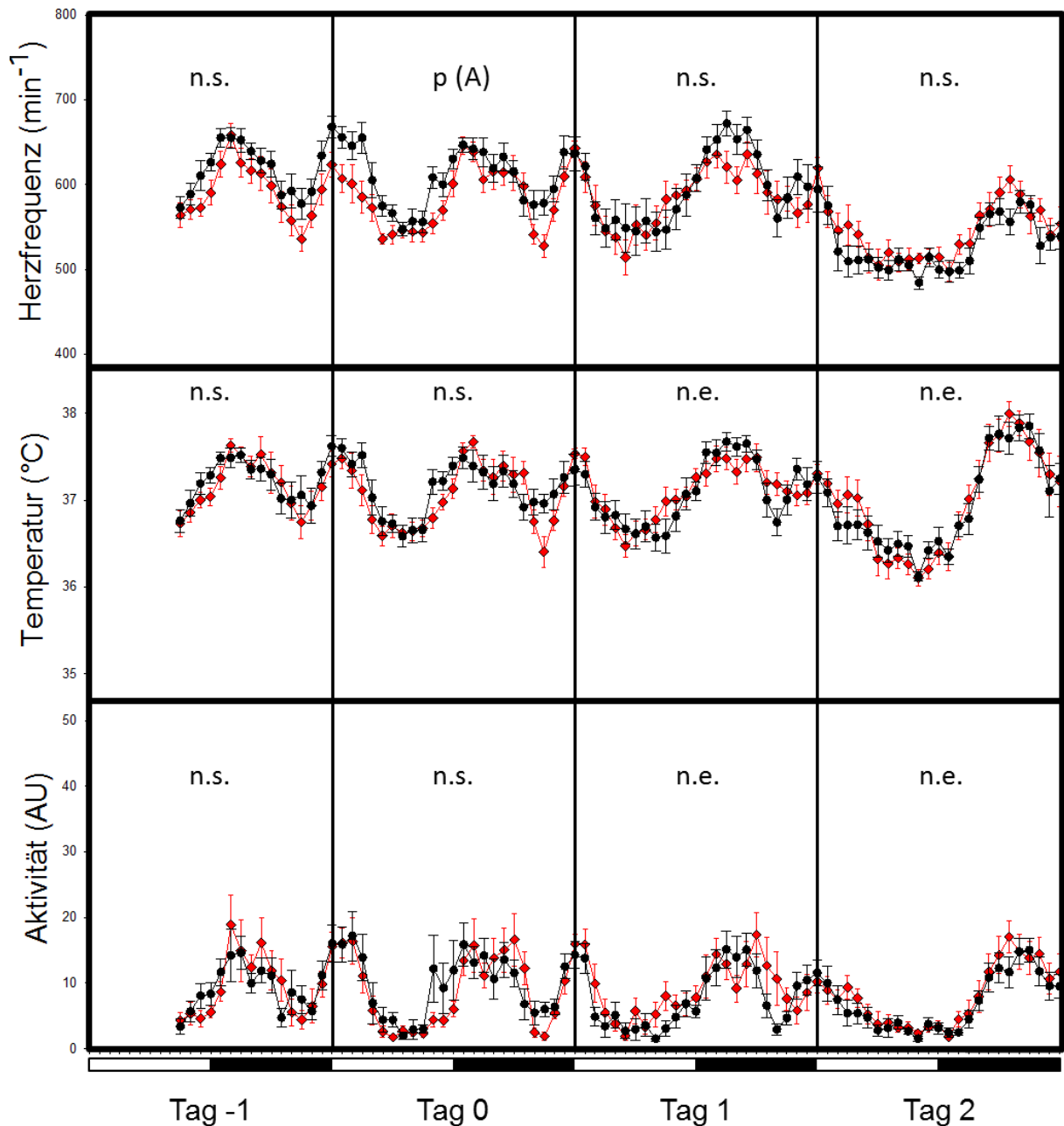


Abbildung 36: Circadianer Biorhythmus von NMRI Mäusen (ip). Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von intraperitoneal injizierten NMRI Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. P (A) beschreibt eine applikationsabhängige Signifikanz. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt.

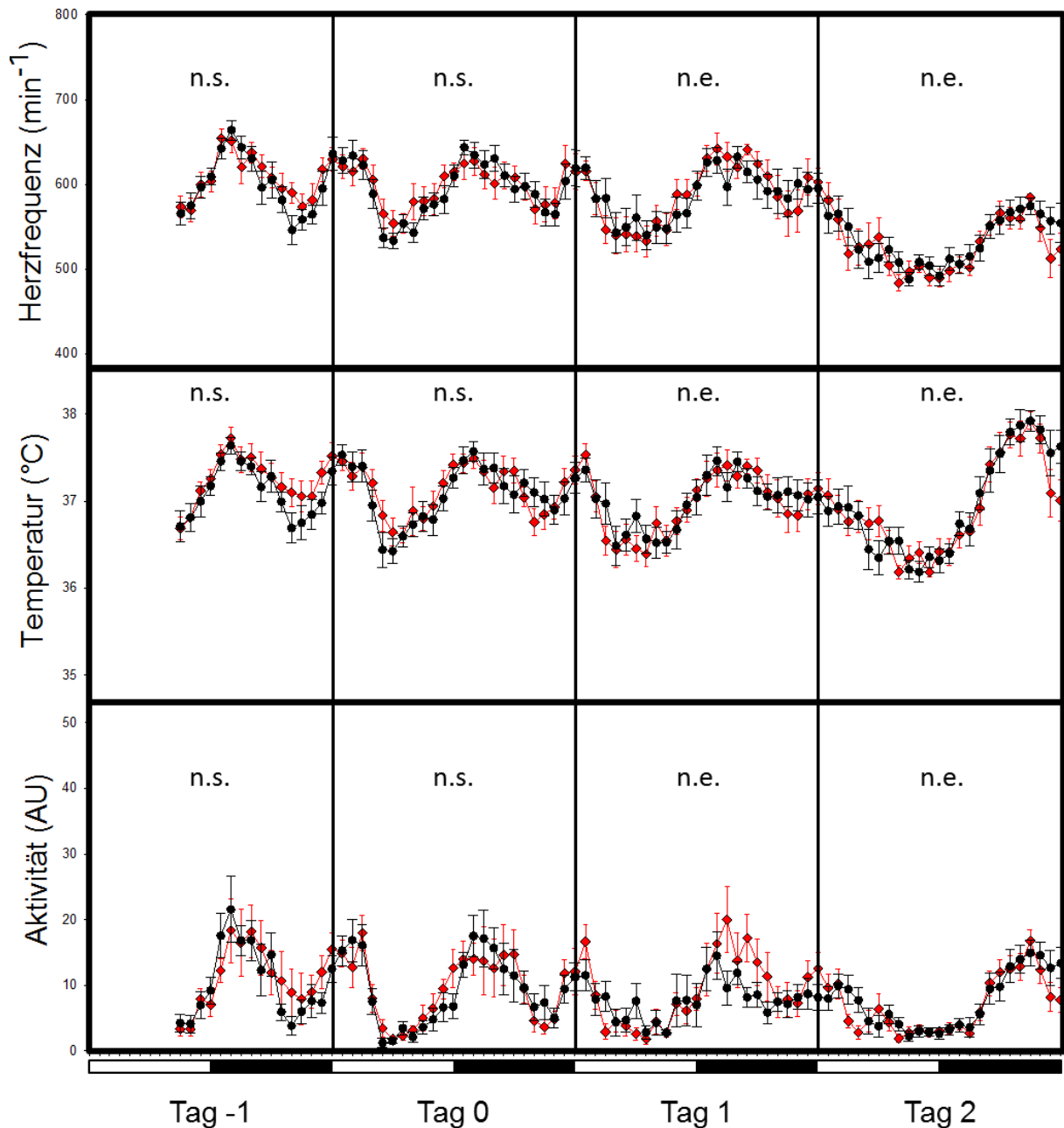


Abbildung 37: Circadianer Biorhythmus von NMRI Mäusen (ipl).

Circadianer Verlauf von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) von intraplantar injizierten NMRI Mäusen (rote Graphen) sowie von lediglich fixierten Kontrollmäusen (schwarze Graphen). Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt.

4.2.4 Ergebnisse der retrobulbären Injektion

Die retrobulbäre Injektion wurde in zwei unabhängigen Versuchsansätzen durchgeführt (siehe Tabelle 3) und fand ausschließlich bei weiblichen Mäusen des Stammes C57BL/ 6J statt. Die Manipulation erfolgte in einer kurzen Inhalationsnarkose mit Isofluran, die unmittelbar vor der Injektion erfolgte. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden ebenfalls in die Kurzzeitinhalationsnarkose versetzt, aber es wurde keine Injektion in den retroorbitalen Venenplexus vorgenommen. Der Zeitpunkt 0 (blaue Linie) stellt den Zeitpunkt dar, zu dem eine Narkosetiefe erreicht wurde, die eine retrobulbäre Injektion erlaubt.

Auch hier wurden die relevanten Zeitperioden der akuten Phase, der Arousalphase und des circadianen Biorhythmus betrachtet und analysiert. Bei der Arousalphase wurden nicht nur 60, sondern 120 Minuten nach dem Eingriff berücksichtigt.

4.2.4.1 Akute Phase

Die akute kardiovaskuläre Reaktion der C57BL/ 6J Mäuse auf die kurze Inhalationsnarkose mit bzw. ohne retrobulbäre Injektion zeigt in Abbildung 38 A und B deutliche Unterschiede zu den charakteristischen Graphen der anderen durchgeführten Injektionstechniken. Wie beschrieben sind die Werte der Herzfrequenz beim C57BL/ 6J Stamm bei den vorher beschriebenen Applikationstechniken über die ersten fünf Minuten nach der Manipulation maximal erhöht und deutlich als ein Plateau zu erkennen. Bei der retrobulbären Injektion steigt die Herzfrequenz direkt zum Zeitpunkt der Manipulation ebenfalls auf dieses hohe Niveau an. Direkt danach sinkt die Herzfrequenz jedoch für ca. zweieinhalb Minuten ab. Anschließend nach Wiedererwachen der Tiere steigen die Werte wieder. Dieser Verlauf kann sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe beobachtet werden und ist in beiden Versuchsansätzen erkennbar. In der Kontrollgruppe steigen die Werte nach dem Abfall höher als bei der Versuchsgruppe. In der Varianzanalyse zeigte sich im zweiten Versuchsansatz eine applikations- und zeitabhängige Signifikanz zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe in der Zeit nach dem Eingriff (siehe Abbildung 38 B, Tabelle 10).

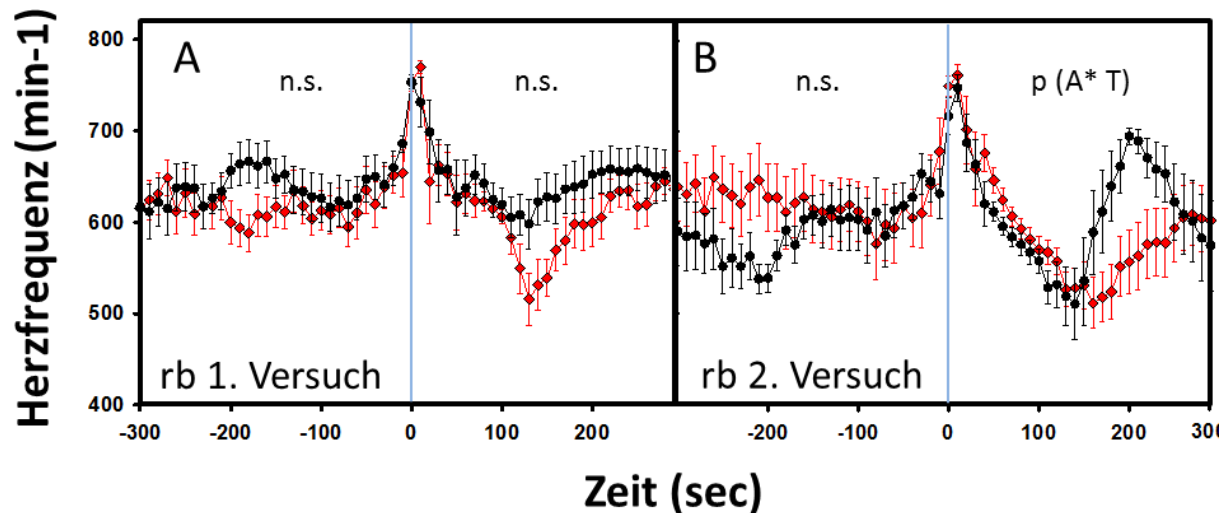


Abbildung 38: Akute Phase von C57BL/6J Mäusen (rb).

Akute Phase der telemetrischen Messungen des Parameters Herzfrequenz bei C57BL/6J Mäusen bei der retrobulbären Injektion (rote Graphen) und bei der entsprechenden Kontrollgruppe in Kurzzeitinhalationsnarkose (schwarze Graphen) bei zwei unabhängigen Versuchen (A = r.b. 1. Versuch bzw. B = r.b. 2. Versuch). Die blaue Linie stellt den Zeitpunkt dar zu dem eine Narkosetiefe erreicht wurde, die eine retrobulbäre Injektion erlaubt. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. P (A*T) bedeutet applikations- und zeitabhängige Signifikanz, n.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate.

4.2.4.2 Arousalphase

Für die Arousalperiode wurden die Parameter Herzfrequenz, Temperatur und Aktivität für die Zeitspanne von 60 Minuten vor bis 120 Minuten nach der retrobulbären Injektion analysiert.

In der Abbildung 39 ist zu erkennen, dass die Herzfrequenz sowohl bei der Versuchs- als auch bei der Kontrollgruppe nach der Injektion für weitere 20 Minuten ansteigt. Erst anschließend kehren die Werte auf das physiologische Basislevel der Tagperiode zurück (siehe Abbildung 39 A und B, oberer Graph).

Weiterhin fällt in den Graphen der Abbildung 39 gegenüber den Graphen aller anderen beschriebenen Applikationstechniken auf, dass sowohl die Mäuse, die eine retrobulbäre Injektion erhalten haben, als auch die Mäuse der ausschließlich in Narkose gelegten Kontrollgruppe einen rapiden Temperaturabfall in den ersten zehn Minuten nach der Manipulation erfahren. Die Temperatur kehrt erst nach einer Stunde zu den physiologischen Werten der inaktiven Tagperiode zurück (siehe Abbildung 39 A und B, mittlerer Graph).

In beiden Versuchsansätzen fanden sich von der Applikationstechnik und Zeit abhängige Signifikanzen zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe. So zeigte sich bei der zweiten Versuchsdurchführung ein applikationsabhängiger signifikanter Unterschied der Körpertemperatur, der aber in der post- prozeduralen Phase nicht anhielt. Für die Zeitperiode

nach der Manipulation ergaben sich in beiden Versuchsdurchführungen applikations- und zeitabhängige signifikante Unterschiede der Herzfrequenz (siehe Abbildung 39, A und B, oberer Graph, Tabelle 10). In den Abbildungen spiegelt sich dieses Ergebnis in der Zeitspanne von ca. 40 bis 80 Minuten nach der Manipulation deutlich wider. In dieser Zeitspanne differieren die Werte für die Herzfrequenz in der Versuchsgruppe (roter Graph) deutlich von denen der Kontrollgruppe (schwarzer Graph) (siehe Abbildung 39 A und B, oberer Graph, Doppelpfeil).

Im ersten Versuchsansatz ergab die RM ANOVA zudem für die Zeitperiode nach der Manipulation eine applikationstechnik- und zeitabhängige Signifikanz der Körpertemperatur zwischen Versuchs- und der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 39 A, mittlerer Graph, Tabelle 10). Diese Signifikanz konnte allerdings im zweiten Versuchsansatz nicht reproduziert werden, wenn auch ein ähnlicher Kurvenverlauf festgestellt wurde wie im Erstversuch (siehe Abbildung 39 B, mittlerer Graph, Tabelle 10).

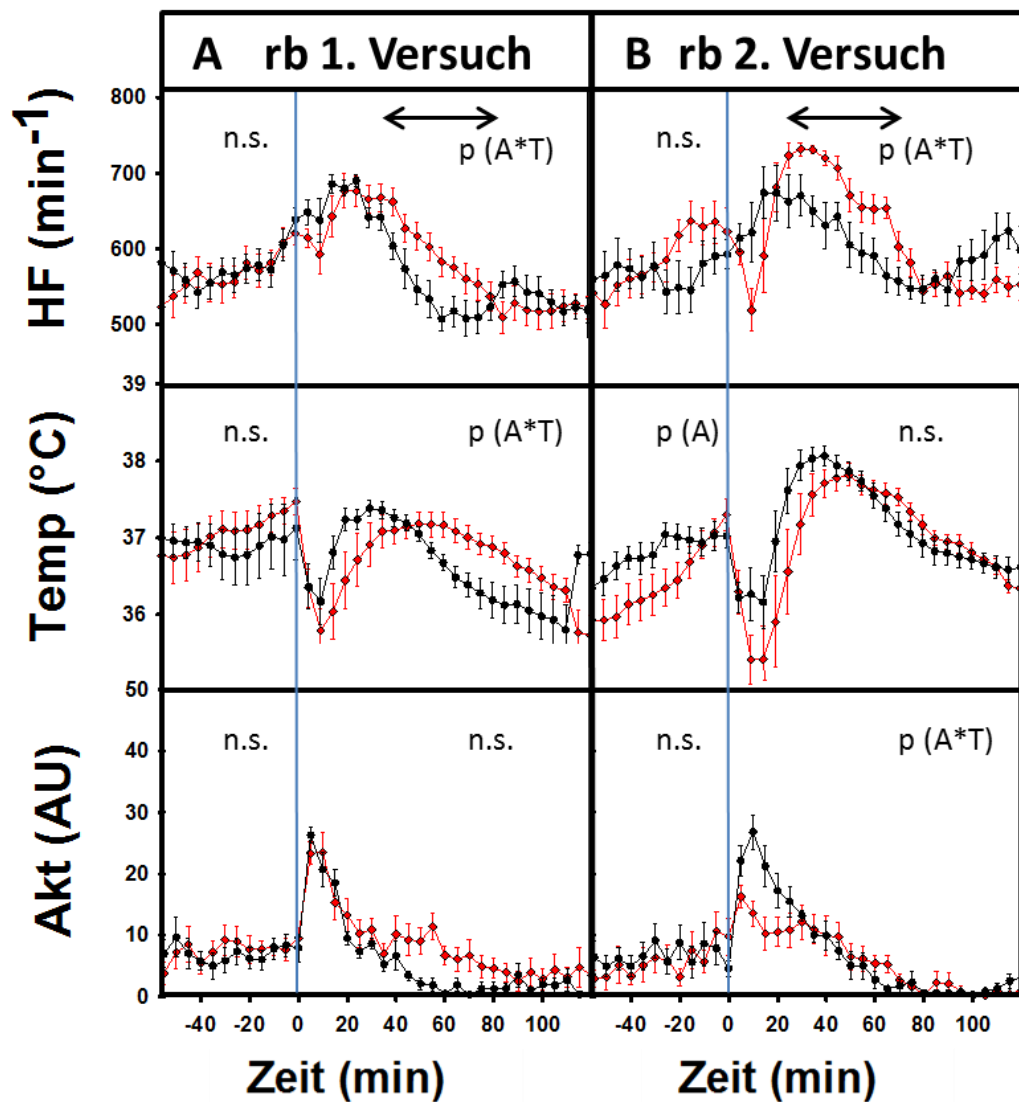


Abbildung 39: Arousalphase von C57BL/6J Mäusen (rb).

Arousalphase der Herzfrequenz (obere Graphen), der Körpertemperatur (mittlere Graphen) und der Aktivität (untere Graphen) von C57BL/6J Mäusen retrobulbärer Injektion (rote Graphen) bzw. bei der Kontrollanästhesie (schwarze Graphen). Der Versuch wurde in unabhängiger Weise zweimal durchgeführt (A,B). Die blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Injektion oder der reinen Fixierung dar. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. Signifikanzen sind durch p (A) (applikationsabhängige Signifikanz) und p (A*T) (applikations- und zeitabhängige Signifikanz) beschrieben. N.s. bezeichnet nicht signifikante Ergebnisse.

4.2.4.3 Circadianer Biorythmus

Abbildungen 40 und 41 zeigen, dass der circadiane Herzfrequenz-, Körpertemperatur- und Aktivitäts- Biorhythmus der C57BL/ 6J Mäuse seinen charakteristische Verlauf im Verlauf der retrobulbären Injektion beibehält und sich nicht gegenüber den anderen Applikationsformen unterscheidet.

Die Manipulation zu Beginn der Tagperiode an Tag 0 stellt sich als Peak dar.

Im ersten Versuchsansatz zeigte sich an Tag 0 eine applikationstechnik- und zeitabhängige Signifikanz zwischen der circadianen Herzfrequenz der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 40, oberer Graph, Tabelle 10). Der signifikante Herzfrequenzunterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe an Tag 0 hielt aber nicht an den Tagen 1 und 2 an. Im Wiederholungsversuch ergaben sich für Tag 0 keinerlei applikations- oder applikations- und zeitabhängige signifikante Unterschiede von Herzfrequenz, Körpertemperatur oder Aktivität. An Tag 1 und 2 fanden im Wiederholungsversuch keine Messungen mehr statt.

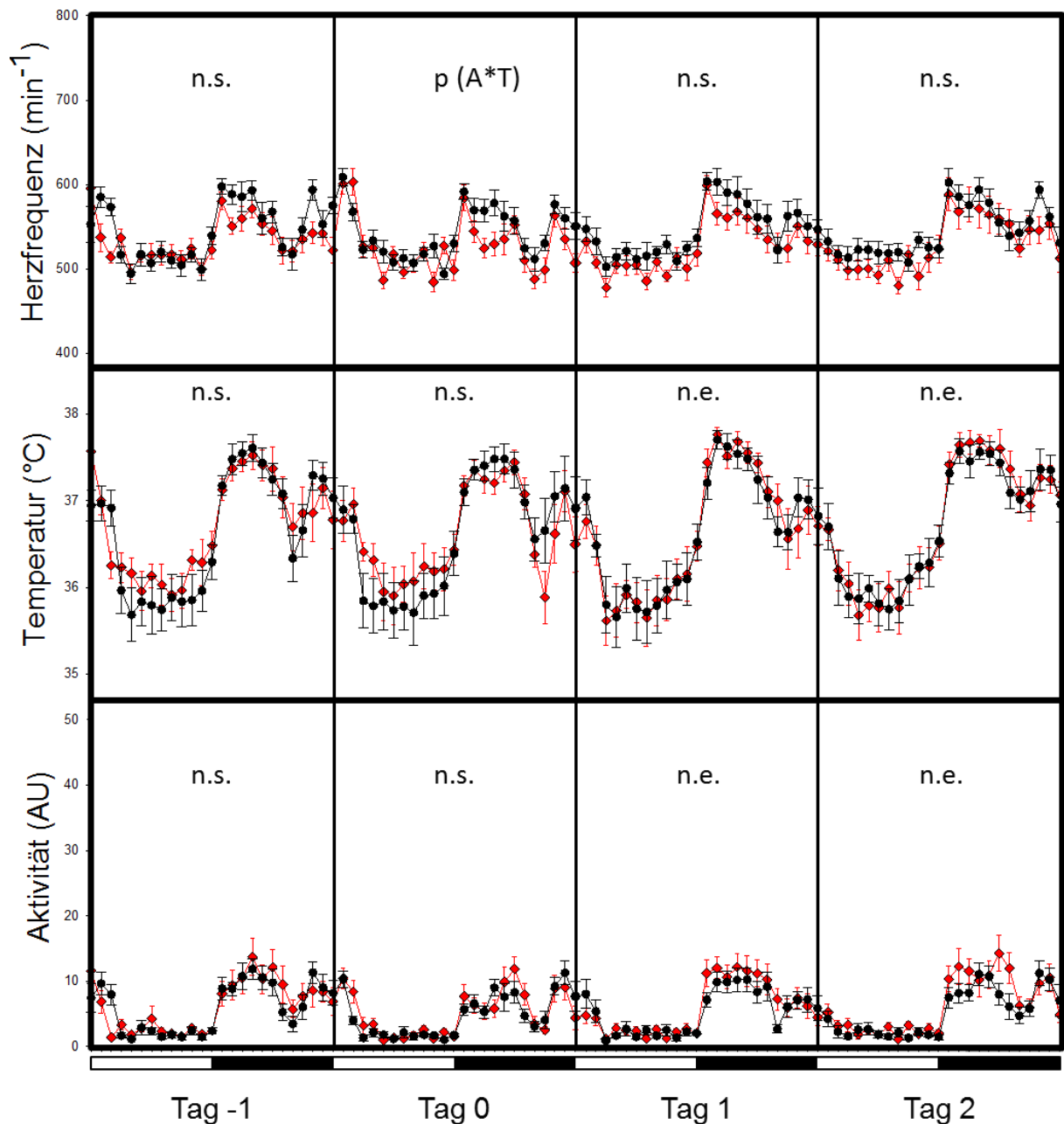


Abbildung 40: Circadianer Biorhythmus von C57BL/6J Mäusen (rb, 1. Versuch).

Circadianer Biorhythmus des 1. Versuchs von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) bei C57BL/6J Mäusen, die einer retrobulbären Injektion (rote Graphen) bzw. einer Kurzzeitinhalationsnarkose (schwarze Graphen) unterzogen wurden. Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. Das Zeichen p (A*T) bezeichnet applikations- und zeitabhängige Signifikanzen. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt.

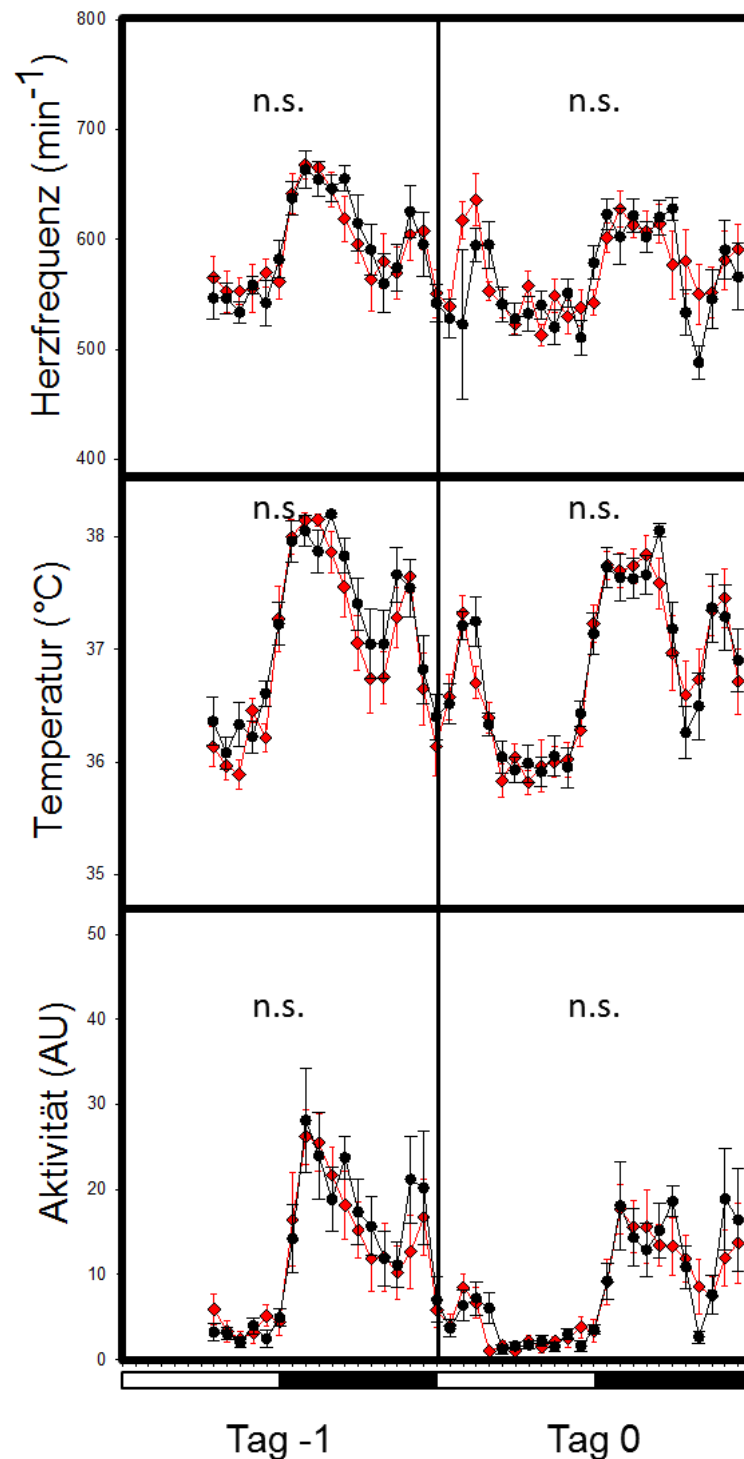


Abbildung 41: Circadianer Biorhythmus von C57BL/6J Mäusen (rb, 2. Versuch). Circadianrhythmik des 2. Versuchs von Herzfrequenz (oberer Graph), Körpertemperatur (mittlerer Graph) und Aktivität (unterer Graph) bei C57BL/6J Mäusen, die einer retrobulbären Injektion (rote Graphen) bzw. einer Kurzzeitinhalationsnarkose (schwarze Graphen) unterzogen wurden. Die Inaktivitätsperiode (Tagphase) ist durch die horizontalen weißen Balken, die Aktivitätsperiode (Nachtphase) durch die horizontalen schwarzen Balken gekennzeichnet. Die Manipulation erfolgte zu Beginn der Inaktivitätsperiode an Tag 0. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. N.s. bezeichnet nicht signifikante Resultate, bei n.e. (nicht ermittelt) wurde keine Varianzanalyse mittels RM ANOVA durchgeführt.

4.2.5 Zusammenfassung der Signifikanzen

Tabelle 10 zeigt für alle untersuchten Techniken und alle untersuchten Mausstämme zusammenfassend die in der RM ANOVA gefundenen Signifikanzen für die analysierten Zeitphasen. Verglichen wurde dabei immer die Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe einerseits separat für die Zeitspanne vor der Manipulation (pre- prozedural) bzw. für die Zeitspanne nach der Manipulation (post- prozedural).

Tabelle 10: Zusammenfassung der statistischen Signifikanzen

Stamm	Applikations- technik	Akute Phase		Arousalphase						Circadianer Biorhythmus					
		HF		HF	BT		Act		HF	BT		Act			
		pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post		
B6	sc	n.s.	p(A*T)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
B6	iv	<i>p(A)</i>	n.s.	n.s.	n.s.	<i>p(A)</i>	n.s.	<i>p(A)</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
B6	ip	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
B6	ipl	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
B6	og	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<i>p(A)</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
B6	rb1	n.s.	n.s.	n.s.	p(A*T)	n.s.	p (A*T)	n.s.	n.s.	n.s.	p(A*T)	n.s.	n.s.		
B6	rb2	n.s.	p(A*T)	n.s.	p(A*T)	<i>p(A)</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
BALB	sc	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	<i>p(A*T)</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
BALB	iv	<i>p(A*T)</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p(A*T)	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
BALB	ip	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
BALB	ipl	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
BALB	og	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
BALB	sc Dunkelperiode	<i>p(A)</i>	p(A)	n.s.	p(A); p(A*T)	n.s.	n.s.	n.s.							
NMRI	sc	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
NMRI	iv	n.s.	n.s.	n.s.	p(A)	<i>p(A)</i>	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		
NMRI	ip	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	p(A*T)	n.s.	n.s.	p(A)	n.s.	n.s.	n.s.		
NMRI	ipl	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.		

Zusammenfassung der Varianzanalyse mittels RM ANOVA von allen drei Mausstämmen und Injektionstechniken für die unterschiedlichen Zeitintervalle. Verglichen wurde die Versuchsgruppe mit der Kontrollgruppe, jeweils dabei separat die Zeit vor der Manipulation und die Zeit nach der Manipulation. Signifikanzen sind durch *p (A)* (applikationstechnikabhängige Signifikanz), *p (A*T)* (applikations- und zeitabhängige Signifikanz) und n.s. (nicht signifikant) beschrieben.

4.3 Ergebnisse der Corticosteronbestimmung

Die Corticosteronbestimmung erfolgte bei C57BL/ 6N Mäusen im Rahmen einer intraplantaren Injektion. Die Blutentnahmen fand jeweils an der Vena facialis zu den Zeitpunkten 0, 10, 15, 20, 30, 40, 50, und 60 Minuten nach der Injektion bzw. bei den Kontrolltieren nach bloßer Fixierung statt.

Abbildung 42 zeigt für die Kontrolltiere (schwarzer Graph) einen charakteristischen Verlauf der Corticosteronserumkonzentration. Die maximale Hormonkonzentration wird nach 15 bis 20 Minuten erreicht und Werte kehren dann nach 50 Minuten zurück auf das Basislevel. In der Versuchsgruppe (roter Graph) zeigt sich ein komplexerer Verlauf der Corticosteronkonzentration der durch zwei Peaks mit dazwischen liegender Absenkung der Werte gekennzeichnet ist. Ein erster Peak der Corticosteronkonzentration wird nach 10 Minuten erreicht mit einem anschließenden Abfall bis 20 Minuten nach der Manipulation. Ein erneuter Anstieg zeigt sich bei der Zeitperiode 30 Minuten nach der Injektion. Anschließend sinken die Werte wieder ab, bis sie nach 50 Minuten auf den Basiswert zurückgekehrt sind. Obwohl die Corticosteronserumkonzentrationen in der Versuchsgruppe zwei Peaks aufweisen während die Kontrollgruppe nur einen Anstieg aufzeigt, erreichen diese Unterschiede keine statistische Signifikanz (Students T- Test) außer zum Zeitpunkt 60 Minuten, an dem der Wert der Versuchsgruppe bereits auf das Basislevel zurückgekehrt ist.

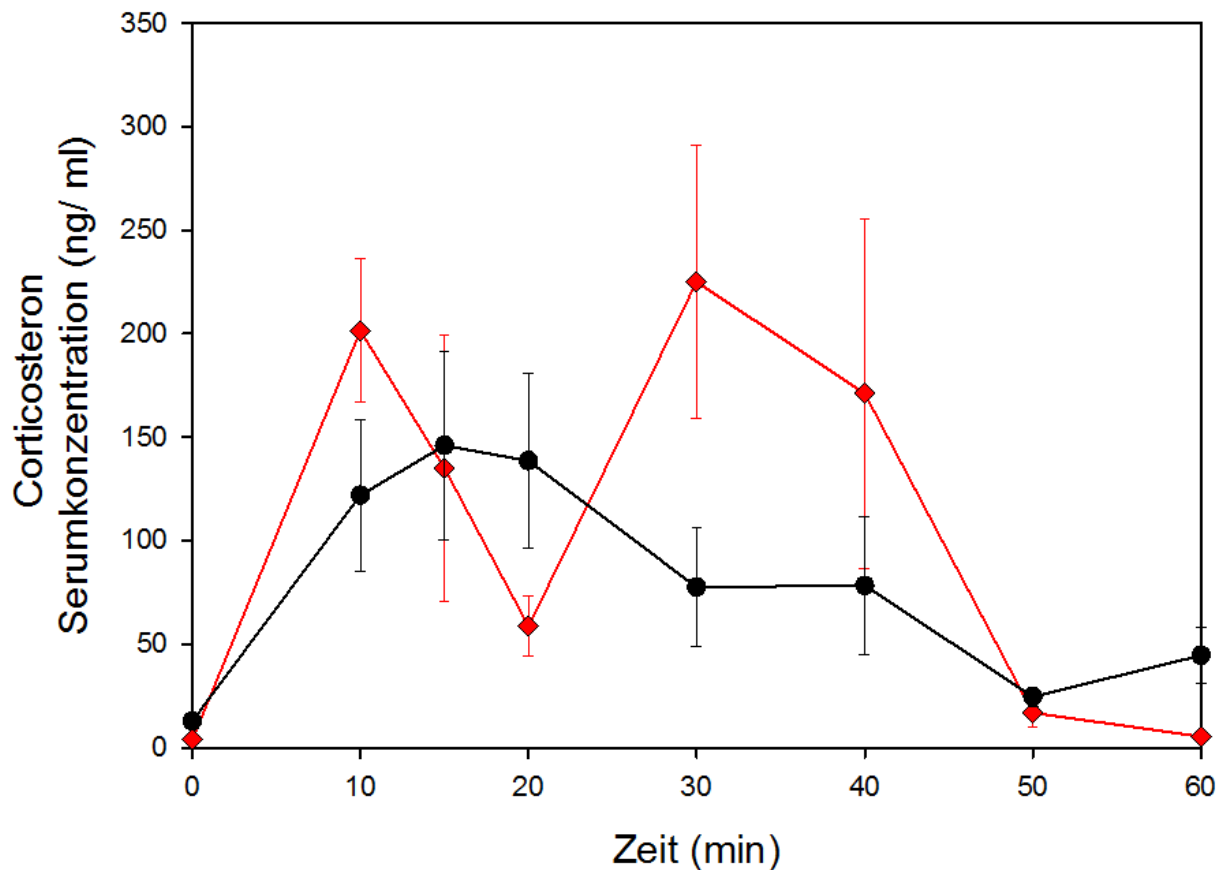


Abbildung 42: Corticosteronwerte von C57BL/ 6J Mäusen (ip).
Corticosteronwerte nach intraplantarer Injektion bei C57BL/ 6N Mäusen (roter Graph) bzw. der Fixierung (schwarzer Graph). Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt

4.4 Ergebnisse der subkutanen Injektion in der Nachtperiode

Ein weiterer Versuchsansatz fand zu Beginn der Aktivitätsperiode (Dunkelperiode) statt. Es wurden 12 BALB/ c Mäuse subkutan injiziert oder entsprechend nur fixiert. Bei diesem Versuch wurden lediglich die akute Phase und die Arousalphase analysiert.

Die dargestellten Kurven in Abbildung 43 zeigen die akute Phase des Herzfrequenzverlaufs bei subkutaner Injektion von BALB/ c Mäusen zu Beginn der Aktivitätsperiode (Dunkelperiode). Im Gegensatz zu dem typischen Verlauf der akuten Phase während der Inaktivitätsperiode (Tag), liegen die Herzfrequenzwerte vor der Manipulation durchgehend auf hohem Niveau. Die Manipulation nimmt kaum einen Einfluss auf die Herzfrequenz und die Herzfrequenzwerte bleiben nach dem Experiment auf dem hohen Niveau erhalten, das sie auch vor dem Eingriff zeigten. Das sonst so charakteristische hohe Plateau in der Zeitspanne nach der Manipulation zeigt sich bei diesem Experiment auch bereits in der Zeit vor der Manipulation. In der Varianzanalyse zeigten sich sowohl vor als auch nach dem Eingriff eine applikationsabhängige Signifikanz zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 43, Tabelle 10).

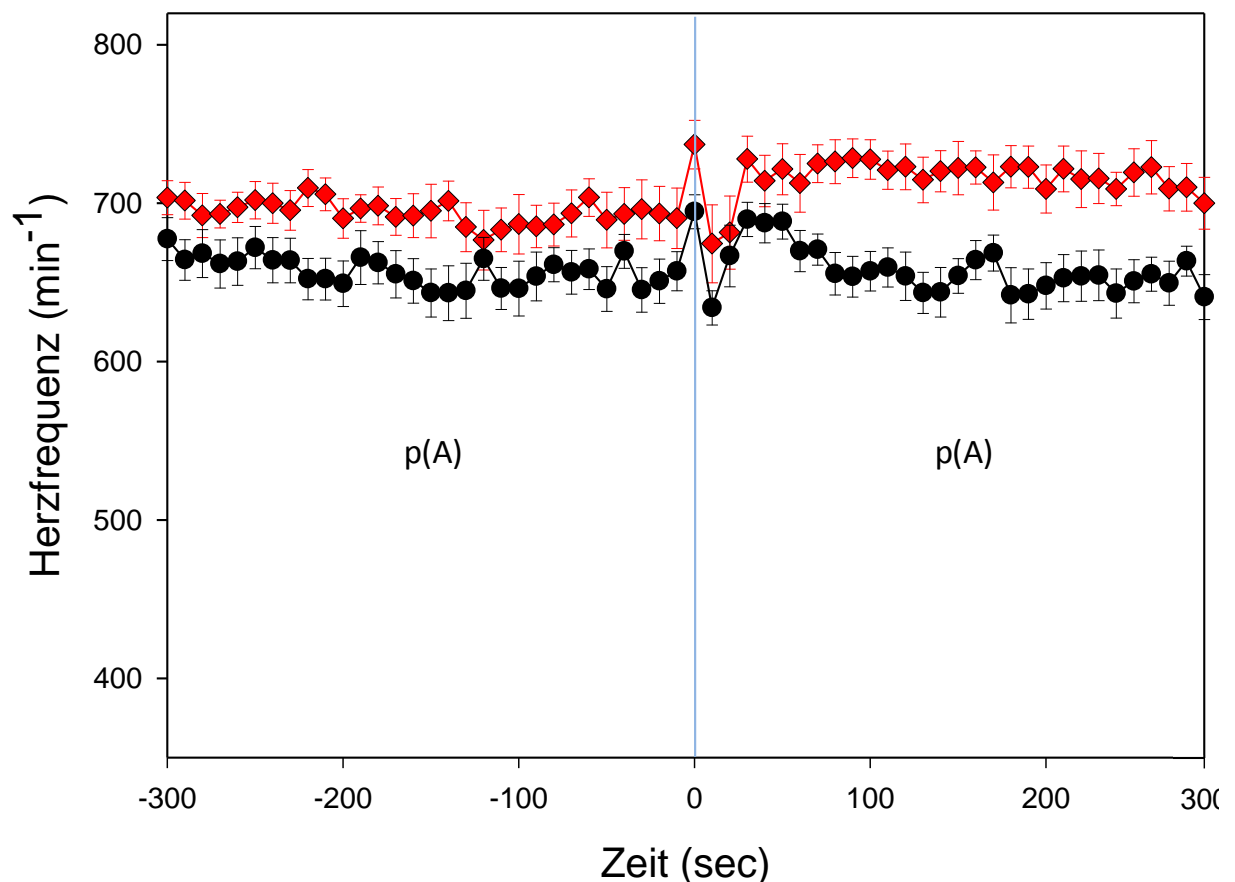


Abbildung 43: Akute Phase von BALB/ c Mäusen (sc in der Nachtperiode).

Akute Phase der Herzfrequenz bei subkutaner Injektion von BALB/ c Mäusen (roter Graph) bzw. bei bloßer Fixierung (schwarzer Graph) in der Dunkelperiode. Die blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Injektion oder reinen Fixierung dar. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. Signifikanzen sind durch $p(A)$ (applikationsabhängige Signifikanz) beschrieben.

Abbildung 44 zeigt die Arousalphase der Herzfrequenz (oberer Graph), der Körpertemperatur (mittlerer Graph) und der Aktivität (unterer Graph) von BALB/ c Mäusen, die in der Nacht subkutan injiziert wurden.

Bei der Versuchsgruppe erreicht die Herzfrequenz ein Maximum von durchschnittlich ca. 700 Schlägen pro Minuten nach fünf Minuten nach der Manipulation und fällt dann schrittweise auf die Basiswerte vor der Manipulation zurück.

Die Temperatur zeigt einen sukzessiven Anstieg in der Zeitperiode vor der Manipulation. Bei der Kontrollgruppe steigt die Körpertemperatur langsam weiter an und fällt dann wieder zurück auf die Werte vor der Manipulation. In der Versuchsgruppe kommt es direkt nach der Manipulation zu einem Abfall mit einem anschließenden Anstieg auf ein Temperaturmaximum. Anschließend fallen die Werte der Körpertemperatur nur langsam schrittweise ab.

Es kommt sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe zu keiner Aktivitätssteigerung nach der Manipulation.

Im Vergleich zu den während des Tages durchgeführten Applikationstechniken fallen folgende Unterschiede auf. Die telemetrisch erfassten Werte von BALB/ c Mäusen, die am Tag injiziert wurden, liegen vor der Injektion bei der Herzfrequenz bei ca. 500 Schlägen pro Minute, bei ca. 36 °C Körpertemperatur und bei 0 AU Aktivität. Sie steigen dann auf ca. 690 Schläge pro Minute, auf ca. 37,5 °C und auf ca. 20 AU an und fallen dann sukzessive über eine Dauer von einer Stunde ab. Bei der Durchführung der Injektion in der Nacht liegen die Werte vor der Injektion tendenziell höher (bei ca. 650 Schlägen pro Minute, ca. 37,5°C, ca. 10 AU). Dadurch ergibt sich ein allmählicher Anstieg der Werte bis zum Zeitpunkt der Applikation, wobei bei Herzfrequenz und Aktivität dieselben Maxima erreicht werden, wie bei der Durchführung am Tag (700 Schläge pro Minute, ca. 20 AU). Bei der Körpertemperatur wird bei nächtlichen Injektionen zum Injektionszeitpunkt ein höheres Maximum (ca. 38°C) erreicht als bei der Durchführung am Tag. Bei nächtlicher Injektion fallen die zum Injektionszeitpunkt erreichten Maxima in der Zeit danach kaum mehr ab. In der Varianzanalyse zeigten sich bei der Herzfrequenz sowohl eine applikationsabhängige Signifikanz zwischen der Versuchsgruppe und der Kontrollgruppe als auch eine applikations- und zeitabhängige Signifikanz in der Zeit nach dem Eingriff (siehe Abbildung 44, Tabelle 10).

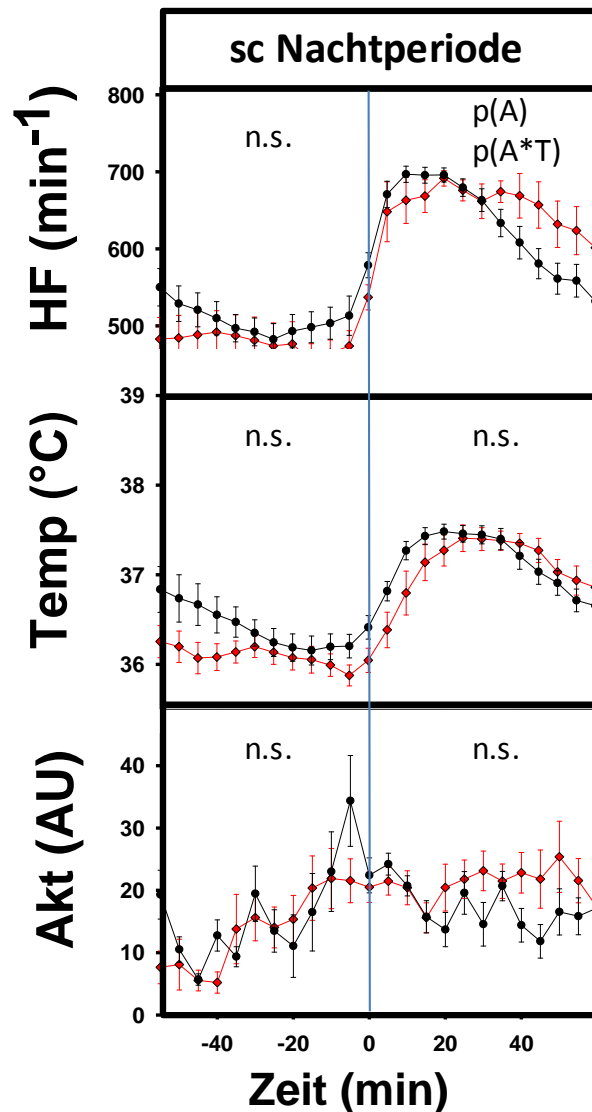


Abbildung 44: Arousalphase von BALB/ c Mäusen (sc in der Nachtperiode).

Arousalphase der Herzfrequenz (oberer Graph), der Körpertemperatur (mittlerer Graph) und der Aktivität (unterer Graph) bei subkutan injizierten BALB/ c Mäusen (rote Graphen) bzw. bei der Fixierung (schwarze Graphen) in der Dunkelperiode. Die blaue Linie stellt den Zeitpunkt der Injektion oder reinen Fixierung dar. Alle abgebildeten Werte sind Mittelwerte, die Standardabweichung (SEM) ist oberhalb und unterhalb der Werte dargestellt. Signifikanzen sind durch $p(A)$ (applikationsabhängige Signifikanz) und $p(A*T)$ (applikations- und zeitabhängige Signifikanz) beschrieben. N.s. bezeichnet nicht signifikante Ergebnisse.

5 Diskussion

Labormäuse (*Mus musculus*) sind die in der biomedizinischen Forschung am häufigsten verwendeten Versuchstiere. Applikationen von Substanzen gehören zu den Routineprozessen im versuchstierkundlichen Alltag und werden in weitgehend standardisierter Form durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wird versucht, eine Einschätzung der Belastung von Versuchstieren durch unterschiedliche Applikationsmethoden zu erhalten. Dabei wurden die subkutane, intravenöse, intraperitoneale, intraplantare und retrobulbäre Injektion sowie die Schlundsondierung berücksichtigt.

5.1 Diskussion der Methode

Die Einführung der EU-Direktive 2010/63/EU und ihre Überführung in nationales Recht der EU Mitgliedsstaaten war mit einer Fokussierung auf die Umsetzung des 3R Konzeptes von Russel und Burch (Russel und Burch, 1959) verbunden. Mit dieser internationalen Tierschutzgesetzgebung schaffte sich Europa die weltweit höchsten Standards für die Nutzung von Tieren in der Forschung (Wells, 2011). Bei der Umsetzung des Refinementgedankens wurde jedoch alsbald klar, dass objektive Beurteilungsmethoden zur Belastungserfassung von Versuchstieren nur in begrenztem Umfang vorhanden sind (Marris, 2009).

Einen Überblick über die Methoden, die in der Forschung für die Erfassung der Belastung von Versuchstieren eingesetzt werden erhält man anhand einer Tabelle von Kretlow und Mitarbeitern (Tabelle 1, (Kretlow et al., 2010)).

Nach dem damaligen Forschungsstand wurden vor allem die telemetrische Erfassung von belastungsrelevanten physiologischen Parametern (Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität) sowie die Quantifizierung von Stresshormonen als objektive und zuverlässige Methode zur Erfassung von Schmerz und Stress beim Versuchstier angesehen (Arras et al., 2007a, Kretlow et al., 2010, Cesarovic et al., 2011). Wir haben deshalb in der vorliegenden Arbeit die telemetrische Erfassung der Herzfrequenz, der Körpertemperatur und der Aktivität zur Abschätzung der Belastung von Mäusen durch unterschiedliche Applikationsmethoden herangezogen. Darüber hinaus haben wir die Quantifizierung des Glucocorticoids Corticosteron im Serum der Tiere als weitere Methode benutzt.

Die Herzfrequenzvariabilität gilt als weiterer potentieller Marker von Stress und Belastung (Thayer et al., 2012) und ist definiert als Herzfrequenzschwankung von Herzschlag zu Herzschlag (Birkhofer et al., 2005). In dieser Arbeit konnte sie keine Berücksichtigung finden, da die Auswertung der Herzfrequenzvariabilität durch die von uns genutzte Software der Messanlage nicht möglich war.

Die Radiotelemetrie erlaubt eine kontinuierliche Datenerfassung von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität von Mäusen, die sich völlig frei in ihrer gewohnten Umgebung bewegen. Dabei ist die Anwesenheit eines Menschen nicht notwendig. Um zuverlässige und reproduzierbare Daten zu erhalten, müssen die telemetrisch durchgeführten Versuche allerdings unter hoch standardisierten Bedingungen verlaufen, um Artefakte und somit falsche Ergebnisse zu vermeiden. Unsere Versuche haben in einem isolierten Raum stattgefunden. In diesem Raum wurden während unserer Versuche über die Belastungserfassung von Applikationsmethoden keine anderen Tiere gehalten. Bis auf den wöchentlichen Käfigwechsel wurde der Raum täglich nur einmal und möglichst kurz von immer der gleichen Person betreten, um den Gesundheitszustand der Tiere und die Trinkwasser- und Futtermenge zu überprüfen. Der Käfigwechsel fand standardisiert immer am gleichen Wochentag statt. Es fanden mindestens 24 Stunden nach dem Käfigwechsel keine Messungen statt, um einen möglichen Einfluss des Käfigwechsels auf die erfassten Parameter zu vermeiden. Mäuse zeigen nach dem Käfigwechsel ausgeprägtes territoriales Verhalten und Explorationsverhalten, was die von uns berücksichtigten physiologischen Parameter verändern könnte (Kramer et al., 1993). Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die mit einem Transponder ausgestatteten weiblichen Tiere mit einem gleichaltrigen Weibchen ohne Transponder als Partnermaus zusammen in einen Käfig gesetzt. Die Partnermaus blieb über den gesamten Versuch immer die gleiche Maus, da ein Partnerwechsel zu vermehrtem Stress der Tiere führen kann. In einer Studie wurde anhand von telemetrischen Daten gezeigt, dass die Herzfrequenz bei Mäusen, die alleine gehalten werden, deutlich höher und die Körpertemperatur niedriger als bei Mäusen ist, die paarweise in einem Käfig gehalten werden (Spani et al., 2003).

Es wird also deutlich, dass bei telemetrischen Studien während der gesamten Versuchszeit standardisierte Bedingungen eingehalten werden müssen, um Artefakte zu vermeiden.

Die Datenerhebung durch die Radiotelemetrie in Mäusen erfordert die Implantation eines Transponders bei den Versuchstieren. Damit die Belastung dieses operativen Eingriffs die Versuchsergebnisse nicht maßgeblich beeinflusst, muss eine ausreichend große Zeitspanne zur Erholung der Mäuse gewährleistet sein. Diese Zeit beinhaltet auch die Gewöhnung an den in der Bauchhöhle liegenden Transponder (Arras et al., 2007a).

Der in unserer Studie verwendete Transpondertyp besitzt ein Gewicht von 1,6 g und ein Volumen von 1,1 cm³.

Baumanns und Mitarbeiter (Baumanns et al., 2001) untersuchten das Körpergewicht und das Verhalten von Mäusen, denen ein weitaus größerer Transponder (3 g) intraperitoneal implantiert worden war und stellten eine über vier Tage anhaltende Gewichtsverminderung nach der Implantation fest. Das Körpergewicht erholte sich aber innerhalb von 14 Tagen. Diese Zeit für die Erholung des Körpergewichts nach der Transponderimplantation konnte von Le-

on und Mitarbeitern (Leon et al., 2004) reproduziert werden. Gleichzeitig konnte die letztgenannte Arbeitsgruppe zeigen, dass der Tagesrhythmus von Körpertemperatur und Aktivität zwar durch die Operation gestört wird, der Biorhythmus aber nach einer Woche wieder den charakteristischen Verlauf aufweist. Aus diesen Studien wird klar, dass durch eine entsprechende Erholungs- und Adaptationszeit eine Störung der Messergebnisse durch die Transponderimplantation oder durch das Tragen des Transponders weitgehend vermieden werden kann. Wir haben eine Zeit von sechs Wochen zwischen der Transponderimplantation und dem Versuchsbeginn gewählt. Ferner trugen die Tiere der Kontrollgruppe ebenfalls einen Transponder in der Bauchhöhle, so dass mögliche Einflüsse des Transponders selbst auf die Messergebnisse auch in der Kontrollgruppe zu verzeichnen waren.

Bei telemetrischen Messungen wird eine sehr hohe Datenmenge erzeugt, was die elektronische Datenverarbeitung und Datenpräsentation sehr erschwert. Um eine Aussage über die Belastung von Tieren durch die Applikationen zu erhalten, ist es zwingend erforderlich, geeignete Messzeiträume festzulegen. In Abhängigkeit von der Größe des gewählten Zeitintervalls ist zudem eine Zusammenfassung der telemetrischen Daten unabdingbar.

Wir haben in der vorliegenden Arbeit Beobachtungszeiträume definiert, die unseres Erachtens relevant sind.

Wir haben die akute kardiovaskuläre Phase definiert als den Zeitraum von 300 Sekunden vor bis 300 Sekunden nach der Applikation. Zur Analyse dieses Intervalls wurden die Daten nicht weiter zusammengefasst, so dass alle zehn Sekunden ein Wert dargestellt wurde. Dies entspricht der maximalen Auflösung der von uns verwendeten Messapparatur. Durch diese Darstellung ist die direkte Wirkung der Applikationen auf die gemessenen Parameter erkennbar. In diesem Intervall hat vor allem die schnell reagierende Herzfrequenz eine hohe Aussagekraft (Thayer et al., 2012). Bei der Temperatur und Aktivität war die Aussagekraft in der akuten Zeitphase weniger eindeutig, so dass wir diese Parameter in der vorliegenden Arbeit nicht darstellen.

Das zweite Zeitmuster, welches wir betrachtet haben, war der Zeitraum von 60 Minuten vor bis 60 Minuten bzw. im Fall der retrobulbären Injektion 120 Minuten nach der Manipulation. Hierfür wurden die Daten über Intervalle von fünf Minuten zu einem Mittelwert zusammengefasst. Auf diese Weise konnten alle Messwerte, die über eine Zeitdauer von fünf Minuten erhoben worden waren, zu einem einzigen Wert komprimiert werden. Diesen Zeitraum haben wir als Arousalphase bezeichnet und deshalb ausgewählt, da bekannt ist, dass die Manipulation von nachtaktiven Versuchstieren in der Helligkeitsphase zu einer charakteristischen Erregungs- bzw. Aufweckreaktion führt, die etwa die Dauer von einer Stunde aufweist. Diese Arousalreaktion konnten wir bei unseren Versuchen klar erkennen. Sie spiegelt sich gut erkennbar bei allen drei gemessenen Parametern wider.

Schließlich untersuchten wir die potentiellen Einflüsse von Applikationen auf den circadianen Biorhythmus von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität. Es ist bekannt, dass physiologische Parameter einen charakteristischen circadianen Biorhythmus aufweisen (Partch et al., 2014). Studien an Ratten und Mäusen zeigten andererseits, dass beispielsweise chronischer Stress eine signifikante Auswirkung auf den Biorhythmus bestimmter physiologischer Parameter haben kann (Pawlyk et al., 2008, Bernatova et al., 2002, Nakata et al., 1993).

Um zu untersuchen, ob die von uns untersuchten Applikationsmethoden den Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität Biorhythmus beeinträchtigen können, haben wir die gewonnenen telemetrischen Daten von einem Tag vor der Manipulation (Tag -1) bis zwei Tage danach (Tage 0, 1 und 2) betrachtet. Dazu wurden die telemetrischen Rohdaten zu Ein- Stunden- Werten zusammengefasst. Mit den so zusammengefassten Daten ist die von Li und Mitarbeitern beschriebene Tagesverlaufskurve der Herzfrequenz deutlich erkennbar (Li et al., 1999). Mit der aufgeführten Datenzusammenfassung über Intervalle von einer Stunde konnten wir die charakteristischen Tagesrhythmen aller drei telemetrisch gemessenen Parameter klar darstellen.

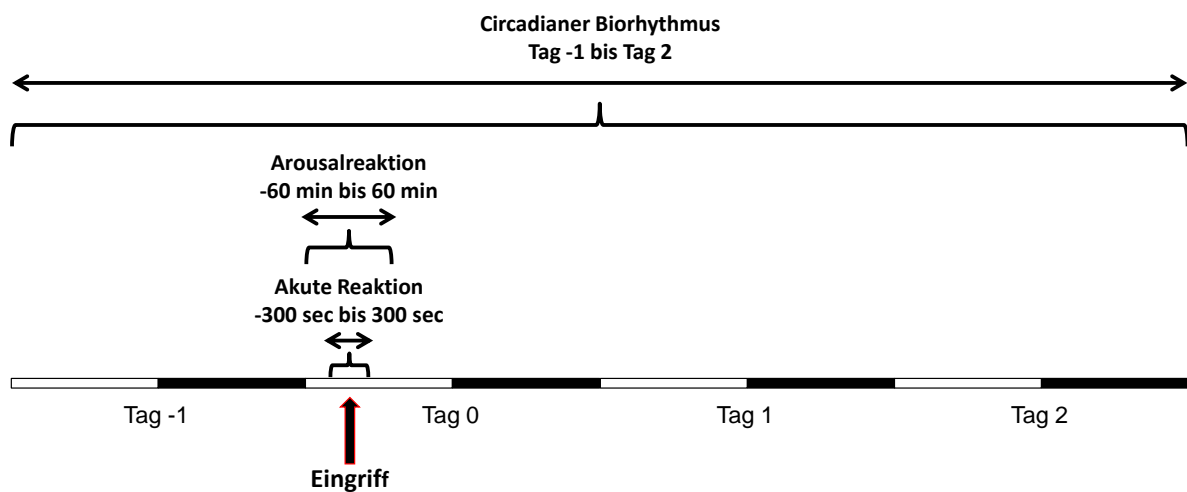


Abbildung 45: Zeitliche Darstellung der Intervalle zur Belastungsbeurteilung von Applikationen.

Die drei gewählten Zeitperioden (akute Phase, Arousalphase und circadianer Biorhythmus) umfassen ein breites zeitliches Spektrum und sind unseres Erachtens geeignet, die Belastung durch kurz andauernde Prozeduren zuverlässig zu erheben. Sie erlauben sowohl eine Aussage über die unmittelbare, als auch über eine mögliche langanhaltende Belastung (siehe Tabelle 10). Somit könnten sie als Standardisierungsansatz für telemetrische Studien angesehen werden, die zum Ziel haben, den Belastungsgrad durch kurzzeitige Eingriffen an Mäusen zu bewerten.

Tabelle 11: Die Phasen der Belastungsbeurteilung

Phase	Zeitintervall	Datenzusammenfassung	Aussage
Akute Phase	-300 sec bis 300 sec	keine Datenzusammenfassung	direkter Einfluss der Manipulation
Arousalphase	-60 min bis 60 min	Mittelwerte aus den Daten alle 5 min	Erregungsreaktionsverlauf
Circadianer Biorhythmus	Tag -1 bis Tag 2	Mittelwerte aus den Daten jede Stunde	Einfluss auf den Biorhythmus

5.2 Stammesunterschiede bei der akuten Herzfrequenz

Die subkutane, intravenöse, intraperitoneale und intraplanare Technik wurden bei allen drei verwendeten Mausstämmen (C57BL/ 6J, BALB/ c und NMRI) getestet.

Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in den durch die Manipulation induzierten Maximalwerten der Herzfrequenz.

C57BL/ 6J und NMRI Mäuse erreichten bei unseren Messungen unabhängig von der Art der Applikation maximale Herzfrequenzen von etwa 750- 800 Schlägen pro Minute (siehe Abbildungen 16, 18). Demgegenüber erreichten BALB/ c Mäuse lediglich maximale Werte von etwa 650 bis 700 Schlägen pro Minute (siehe Abbildung 17).

In der akuten Phase der C57BL/ 6J Mäuse wird die durch den Eingriff erreichte extrem hohe Herzfrequenz stabil über die gesamten fünf Minuten nach der Manipulation aufrechterhalten. Die akuten Herzfrequenzwerte bilden geradezu ein Plateau in den ersten fünf Minuten nach der Applikation (siehe Abbildung 16). Dies weist auf eine extreme Stimulation des Sympathikus über die gesamte post- prozedurale akute Phase hin. Ein vergleichbares Plateau der Herzfrequenzwerte nach Durchführung der Prozedur war bei den BALB/ c Mäusen nicht oder deutlich schwächer ausgeprägt (siehe Abbildung 17). Bei den NMRI Mäusen war ein solches Plateau ebenfalls erkennbar (siehe Abbildung 18).

Die aufgeführten Stammesunterschiede waren nicht nur bei den Versuchsgruppen, sondern in tendenziell sehr ähnlicher Weise auch bei den lediglich fixierten Kontrolltieren erkennbar. Dies macht klar, dass die in der akuten Phase beobachteten typischen kardialen Reaktionen schon durch die Fixierung der Tiere allein induziert worden waren.

Um die beobachteten Stammesunterschiede statistisch abzusichern, wurden die akuten post- prozeduralen Herzfrequenzwerte der bei den subkutan, intravenös, intraperitoneal und

intraplantar Versuchen verwendeten Kontroll- BALB/ c- Weibchen mit denen von C57BL/ 6J und NMRI Mäusen verglichen (RM ANOVA). Die ermittelten Signifikanzen sind in Tabelle 9 aufgezeigt. Die beobachteten stammesabhängigen Unterschiede werden durch die RM ANOVA in eindeutiger Weise bestätigt. So zeigten sich in den 300 Sekunden nach der entsprechenden Manipulation applikationsabhängige Signifikanzen zwischen den C57BL/ 6J und BALB/ c Mäusen und zwischen den NMRI und BALB/ c Mäusen. Diese Signifikanzen konnten nicht im Vergleich von C57BL/ 6J Mäusen mit NMRI Mäusen gezeigt werden. Dieses Ergebnis macht deutlich, dass die akute Reaktion der Herzfrequenz auf die Fixierungstechniken bei BALB/ c Mäusen weniger ausgeprägt ist als bei den Mäusen der C57BL/ 6J und NMRI Stämme.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Dauer der vermutlich durch Sympathikusaktivierung induzierten extremen Tachykardie eindeutig durch den genetischen Hintergrund der Tiere beeinflusst wird. Eine Vielzahl früherer Verhaltensstudien zeigte, dass BALB/ c Mäuse stressreaktiver und anfälliger für Angst sind als die stressresistenteren C57BL/ 6J Mäuse (Anisman et al., 1998, Tannenbaum und Anisman, 2003, Belzung und Griebel, 2001, Griebel et al., 2000, Augustsson et al., 2005). Die Erkenntnisse decken sich nicht mit den Ergebnissen unserer Studie. Unsere telemetrischen Messungen und ihre Auswertungen sprechen eher dafür, dass die BALB/ c Mäuse stressresistenter sind als die C57BL/ 6J und NMRI Mäuse.

5.3 Gesamtvergleich aller telemetrischer Ergebnisse

In Tabelle 10 sind alle in der RM ANOVA zwischen Versuchstieren mit kombinierter Applikation und Fixierung und Kontrolltieren mit bloßer Fixierung detektierten applikationsabhängigen und applikations- und zeitabhängigen Signifikanzen übersichtlich dargestellt. Dabei wurden alle untersuchten Mausstämmen (C57BL/ 6J, BALB/ c und NMRI), alle untersuchten Parameter (Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität) sowie alle Analysezeiträume (akute Phase, Arousalphase, circadianer Rhythmus) berücksichtigt.

Es zeigen sich bei den unterschiedlichen Applikationstechniken, Mausstämmen und Zeitintervallen mehrere Signifikanzen zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe, die in die Zeit vor dem entsprechenden Eingriff (pre- prozedurale Phase) fallen. Diese pre-prozeduralen Signifikanzen halten nach dem Eingriff nicht an. Diese signifikanten Unterschiede können nicht experimentell bedingt sein. Sie zeigen uns aber, dass sich die telemetrisch erfassten Parameter offensichtlich auch unter Normalbedingungen ohne einen Stressstimulus signifikant unterscheiden können. Es liegt auf der Hand, dass solche zufällig entstandenen Signifikanzen auch in der post- prozeduralen Phase des Experimentes auftreten können. Dies bedeutet aber, dass eine einzelne statistische Signifikanz der gemessenen

Parameter Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität zwischen der Versuchs- und Kontrollgruppe in der post- prozeduralen Phase nicht ausreicht, um festzulegen, dass die jeweilige Applikationsform eine über die Fixierung hinaus gehende Belastung verursacht. Wir haben deshalb nach solchen Experimenten Ausschau gehalten, bei denen zwischen den behandelten Tieren und den Kontrollen gehäuft Signifikanzen in der post- prozeduralen Phase auftraten. Solche Häufungen von Signifikanzen interpretieren wir als relevant.

5.3.1 Bewertung der sc, iv, ip, ipl Injektionstechniken und der Schlundsondierung

Eine Häufung von signifikanten Unterschieden zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe finden wir bei den subkutanen, intravenösen, intraperitonealen, intraplantaren Applikationsmethoden und der Schlundsondierung nicht (siehe Tabelle 10). Wir schließen daraus, dass diese Injektionen und die Schlundsondierung eine einheitliche Gruppe von Applikationstechniken darstellt, bei denen gemessen an den telemetrischen Parametern die Belastung der Tiere allein durch die Fixierung diktiert wird und die Applikation keine weitere Belastung induziert.

Diese Gruppe an Eingriffen ist durch eine sofortige Erregungsreaktion der Parameter Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität mit einem sukzessiven Abfall der Werte in der Zeit nach der Manipulation gekennzeichnet.

Die bei der Applikation erreichte maximale Herzfrequenz war bei C57BL/ 6J und NMRI Mäuse mit etwa 750 bis 800 Schlägen pro Minute zwar höher als bei den BALB/ c Mäusen mit einem Maximum von etwa 650 bis 700 Schlägen pro Minute, aber alle drei Stämme zeigten die gleiche Erholungsdauer von ca. einer Stunde bis zur Normalisierung der Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität Werte auf das Ausgangsniveau. Zusammenfassend zeigen unsere telemetrisch ermittelten Daten bei subkutaner, intravenöser, intraperitonealer, intraplantarer Applikation und Schlundsondierung deutlich auf, dass die Reaktion der Parameter Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität ausschließlich auf die psychologische Fixierungskomponente zurückzuführen ist und nicht weiter vom physischen Applikationsstress beeinflusst wird. Diese Folgerung stimmt mit einer von Cinelli und Mitarbeitern durchgeführten Studie überein (Cinelli et al., 2007). Sie fanden eine identische Erregungsreaktion mit anschließender Normalisierung bei C57BL/ 6J Mäusen, an denen unterschiedliche Techniken der Gewebeprobeentnahme durchgeführt wurden. Der Fokus dieser Studie lag auf der Fragestellung der Belastung von Mäusen durch verschiedene Probeentnahmetechniken, wie sie für die Genotypisierung von Tieren erforderlich sind (Ohr- oder Schwanzbiopsie, Haarzupfprobe und Mund- und Rektumtupfer). Ähnlich wie bei unserer Studie dienten hier aber auch lediglich fixierte Mäuse als Kontrollen. Die Cinelli Gruppe fand keine signifikanten Un-

terschiede zwischen fixierten Kontrolltieren und Tieren, die den diversen Probeentnahmeverfahren ausgesetzt waren. Das Muster der bei den C57BL/ 6J Tieren vorgefundenen Herzfrequenz-, Körpertemperatur- und Aktivitätsveränderung ist dem in der vorliegenden Arbeit detektierten Muster verblüffend ähnlich. Bei beiden Arbeiten wird das Reaktionsmuster der Tiere allein durch das Handling und die Fixierung der Tiere diktiert und nicht durch den Eingriff, für den die Fixierung überhaupt durchgeführt wird.

Anhand der beschriebenen Aussagen liegt die allgemeine Schlussfolgerung nahe, dass das Handling und die Fixierung bei allen nicht-chirurgischen, kurzfristigen Eingriffen an der Maus die übergeordnete Rolle für die Einschätzung der Belastung spielt.

5.3.2 Bewertung der retrobulbären Injektion

Bei den statistischen Analysen der retrobulbären Injektion von C57BL/ 6J Mäusen zeigten sich in der post- prozeduralen Phase eine Häufung von Signifikanzen zwischen den retrobulbär injizierten Versuchstieren und den ausschließlich einer Kurzzeitinhalationsnarkose ausgesetzten Kontrolltieren. Hier finden wir im ersten Versuch applikations- und zeitabhängige signifikante Unterschiede sowohl bei der Herzfrequenz und Körpertemperatur in der Arousalphase als auch bei der Herzfrequenz an Tag 0 des circadianen Biorhythmus (siehe Tabelle 10). Im unabhängig durchgeführten Wiederholungsversuch (2. Versuch) traten ebenfalls mehrere post- prozedurale Signifikanzen auf. Im Detail fanden sich neben der applikations- und zeitabhängige Signifikanz der Herzfrequenz in der Arousalphase auch applikations- und zeitabhängige Signifikanzen bei der Herzfrequenz in der akuten Phase und bei der Aktivität in der Arousalphase (siehe Tabelle 10). Interessant ist, dass bei den beiden Versuchsdurchführungen die Häufung von Signifikanzen prinzipiell reproduzierbar war, dass aber bis auf die applikations- und zeitabhängige Signifikanz der Herzfrequenz in der Arousalphase, die bei beiden Experimenten beobachtet werden konnte, unterschiedliche Parameter oder Messphasen betroffen waren.

Bei beiden experimentellen Testungen der retrobulbären Injektion zeigte sich in der Arousalphase in der Zeitperiode von 40 Minuten bis 80 Minuten nach der Manipulation eine deutliche Erhöhung Herzfrequenz der Versuchstiere (siehe Abbildung 39). Wir interpretieren diese vorübergehende Tachykardie als eine schmerzinduzierte Reaktion, die von dem injektionsinduzierten Gewebeschaden ausgeht. Diese Interpretation deckt sich mit den histologischen Ergebnissen, die in Zusammenarbeit mit einer mit uns kooperierenden Arbeitsgruppe angefertigt wurden (Kränzlin et al., 2013). Bei allen Tieren, die 48 Stunden nach der retrobulbären Injektion untersucht wurden, zeigten sich moderate bis schwere Nekrose des peribulbären Gewebes. In den meisten Fällen war die Hardersche Drüse betroffen. Bei einigen Tieren zeigten sich jedoch auch entzündliche Reaktionen des Augenmuskels, der in unmittelbarer

Nähe der Retina und des Augennervs liegt (siehe Abbildung 46 A, B). Acht Tage nach der retrobulbären Injektion konnten noch moderate granulomatöse Veränderungen festgestellt werden (siehe Abbildung 46 C). 15 Tage nach der Manipulation traten nur noch minimale Veränderungen auf. Drei Wochen nach der Injektion zeigte sich bei wenigen Tieren noch eine geringe chronische Reaktion (siehe Abbildung 46 D).

Bei der retrobulbären Injektion kommt es mithin häufig zu einer Verletzung der Harderschen Drüse bzw. des Augenmuskels (Kränzlin et al., 2013). Diese Gewebeschädigung könnte für bei beiden retrobulbären Versuchen vorgefundene signifikante Herzfrequenzerhöhung im Zeitraum von 40 Minuten bis 80 Minuten nach der Manipulation verantwortlich sein. Diese Schädigungen machen auch die in einem Experiment vorgefundene gestörte Herzfrequenz Circadianrhythmik am Tag der Injektion (Tag 0) plausibel.

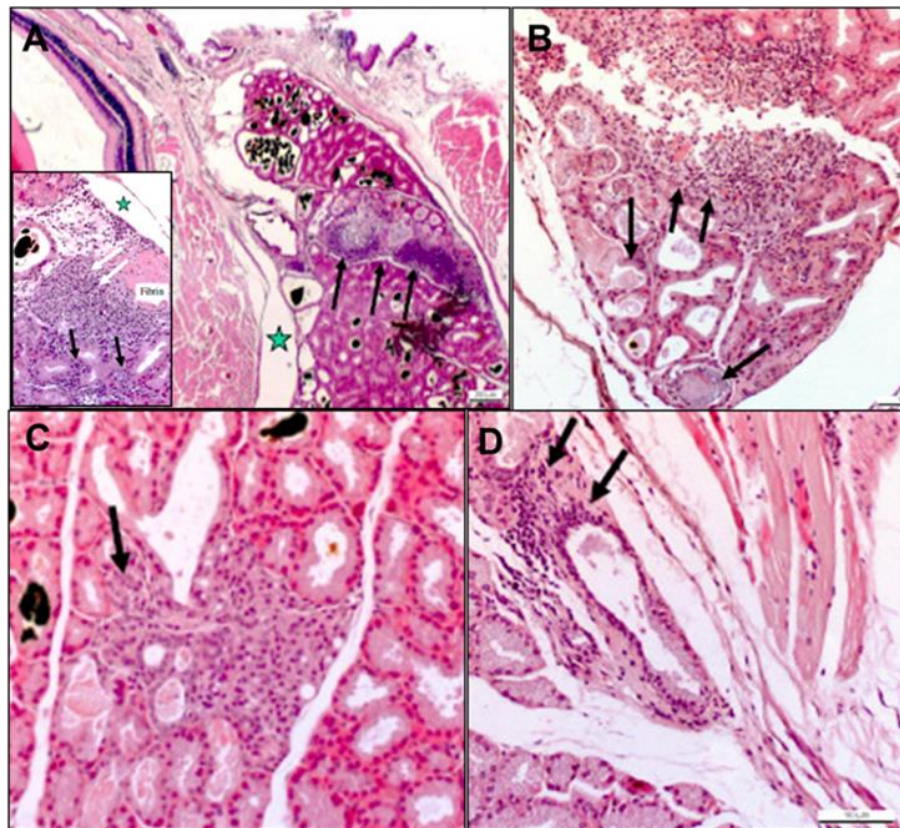


Abbildung 46: Gewebeschaden nach retrobulbärer Injektion. (A, B: 2 Tage nach der Injektion, C: 8 Tage nach der Injektion, D: 21 Tage nach der Injektion). A und B zeigt eine Hardersche Drüse mit massiven (A) und moderaten (B) Nekrosen (schwarze Pfeile) verbunden mit einer Infiltration von neutrophilen Granulozyten. C zeigt moderate granulomatöse Veränderungen des Gewebes der Harderschen Drüse mit Infiltration von Histiozyten und Lymphozyten. D zeigt geringfügige granulomatöse Veränderungen des Gewebes der Harderschen Drüse mit Infiltration von Histiozyten und Lymphozyten (Kränzlin et al., 2013).

Das in unseren Arbeiten ausgemachte besondere Belastungspotential von retrobulbären Injektionen wird durch eine andere Studie bestätigt. So konnten Steel und Mitarbeiter (Steel et al., 2008) ebenfalls lokale Entzündungen nach retrobulbärer Injektionen einer Prüfsubstanz über fünf Tage finden. Die GV- SOLAS empfiehlt die retrobulbäre Injektion grundsätzlich nicht aufgrund der zu erwartenden traumatisch bedingten Gewebeveränderungen. Sie gibt zu bedenken, dass weder sicher intravenös appliziert werden kann, noch das intravasal applizierte Volumen gesichert bestimmt werden kann. Allerdings stuft sie in Abhängigkeit von den Fertigkeiten des jeweils Durchführenden die retrobulbäre Injektion als geringe Belastung ein (GV-SOLAS, 2012).

Aufgrund unserer eigenen telemetrischen Untersuchungen sowie insbesondere aufgrund der histologischen Befunde der kooperierenden Arbeitsgemeinschaft Kränzlin schätzen wir die retrobulbäre Injektion jedoch als eine Applikationsmethode ein, die das Potential zu einer mittelgradigen Belastung für die Labormäuse hat.

5.4 Belastungsbeurteilung der intraplantaren Injektion anhand der Corticosteronbestimmung

Unsere telemetrischen Analysen hatten ergeben, dass bei subkutaner, intravenöser, intraperitonealer, intraplanter Applikation und Schlundsondierung das Handling und die Fixierungskomponente die übergeordnete Rolle für die Einschätzung der Belastung spielen. Dieses Resultat wird durch unsere Ergebnisse der Corticosteronbestimmung untermauert.

Bei diesem Experiment wurden die Corticosteronserumkonzentrationen nach einer intraplanteren Injektion bzw. der entsprechenden Fixierungstechnik mittels eines ELISA-Tests bestimmt. Da die telemetrisch gemessenen Werte für die benannten Applikationstechniken einen sehr ähnlichen Reaktionsverlauf aufgewiesen haben und da die Corticosteron-Experimente sehr aufwendig waren, haben wir uns auf eine Injektionstechnik beschränkt.

Die Ergebnisse der Corticosteronbestimmung entsprechen den telemetrischen Ergebnissen. Sowohl die Fixierung mit anschließender Injektion, als auch die bloße Fixierung bewirken eine Aktivierung der HHNA und damit eine eindeutige Corticosteronerhöhung im Serum, die nach ungefähr einer Stunde wieder zu den Basalwerten zurückkehrt. Im Students T-Test tritt eine von uns als irrelevant betrachtete Signifikanz 60 Minuten nach der Manipulation auf. Zu diesem Zeitpunkt haben sich die Corticosteronwerte bereits auf die Ausgangswerte zum Zeitpunkt 0 normalisiert. Zu allen anderen Zeitpunkten zeigen sich keine Signifikanzen zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe. Die Corticosteronwerte bestätigen also, dass der psychologische Stress, der durch das Handling und die Fixierung erzeugt wird, entschei-

dend für die Aktivierung der HHNA ist, während die physische Stresskomponente der Applikation keinen weiteren Einfluss mehr auf dieses neuroendokrine System nimmt.

In einer Studie von Schaefer und Mitarbeitern wurde ein ähnliches Ergebnis festgestellt (Schaefer et al., 2010). Anhand einer Serumcorticosteronanalyse wurde gezeigt, dass bei neugeborenen Mäusen nach der Zehenamputation zu Markierungszwecken die Erhöhung der Corticosteronwerte durch das Handling während der Amputation und nicht durch die Amputation an sich hervorgerufen wurde, also analog zu unserer Studie das Handling alleine die Stressantwort induzierte. Allerdings muss hier in Betracht gezogen werden, dass die Zehen zum Zeitpunkt der Amputation noch nicht innerviert sind.

Die Feststellung, dass die Corticosteronausschüttung einen ähnlichen Verlauf aufzeigt, wie der Verlauf der Herzfrequenz in der Arousalphase, deckt sich mit den Daten einer Studie von Meijer und Mitarbeitern (Meijer et al., 2007). In dieser Studie wurden die Verläufe von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Serumcorticosteron im Rahmen einer bloßen Fixierung analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Anstieg der Herzfrequenz, aber auch der Anstieg der Temperatur, mit dem Anstieg der Corticosteronwerte korrelieren. Den von uns dargestellten Zeitverlauf des Corticosteronanstiegs als Reaktion auf eine Manipulation zeigten auch Benedetti und Mitarbeiter in einer Schmerzstudie (Benedetti et al., 2012).

Wir haben die Erfahrung gemacht, dass bei Corticosteronmessungen unbedingt auf die Methode geachtet werden muss, um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Bei Messungen im Serum muss die Blutentnahme sehr schnell erfolgen, um den Einfluss der Blutentnahme an sich auf die HHNA und somit auf die Messwerte auszuschließen (Vahl et al., 2005, de Jong et al., 2001). Werden die Corticosteronkonzentrationen im Kot oder Urin bestimmt, so muss unbedingt bedacht werden, dass die Ausscheidung von Glucocorticoiden zeitlichen Schwankungen unterliegt und damit die Aussagekraft gestört sein kann (Touma et al., 2004, Touma und Palme, 2005).

5.5 Ausblick: Präliminäre Beurteilung der subkutanen Injektion in der Dunkelperiode

Für die subkutane, intravenöse, intraperitoneale, intraplantare Applikationsmethoden und die Schlundsondierung konnten wir aufzeigen, dass das Handling und die Fixierung und nicht die Applikation selbst entscheidend für die Einschätzung der Belastung sind. Allerdings basieren diese Ergebnisse auf telemetrischen Messungen in der Inaktivitätsphase der Tiere und die Verläufe von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität sind sowohl in der akuten als auch in der Arousalphase durch die Aktivierung (Aufwachen) der Tiere charakterisiert.

In einem ersten Versuchsansatz haben wir deshalb eine subkutane Injektion in die Aktivitätsphase der Tiere gelegt. Dabei wurde der BALB/ c Stamm verwendet, da er bei den Versuchen in der Helligkeitsperiode im Vergleich zu den C57BL/ 6J und NMRI Stämmen nur relativ geringe eingriffsbedingte Herzfrequenzanstiege zeigte.

Bei der in der Dunkelperiode durchgeführten subkutanen Injektion fanden sich in der akuten Phase (300 Sekunden vor bis 300 Sekunden nach dem Eingriff) applikationsspezifische signifikante Unterschiede der Herzfrequenz zwischen Versuchs- und Kontrolltieren. Da diese signifikanten Unterschiede aber bereits vor der Manipulation auftraten, sind sie nicht aussagekräftig.

Bei der Arousalphase (60 Minuten vor bis 60 Minuten nach dem Eingriff) fanden wir p(A) und p(A*T) spezifische signifikante Unterschiede der Herzfrequenzen zwischen Versuchs- und Kontrolltieren. Diese Unterschiede betrafen lediglich die post- prozedurale und eben nicht die pre- prozedurale Phase des Eingriffs.

Da wir nur eine telemetrische Messung in der Aktivitätsphase der Tiere durchgeführt haben, müssen die Ergebnisse vorsichtig interpretiert werden. Es muss aber klar festgehalten werden, dass die Möglichkeit besteht, dass sich in der Aktivitätsperiode vielleicht eher ein signifikanter Einfluss der Injektion selbst nachweisen lässt. In der Inaktivitätsphase waren die Verläufe von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität bei der Durchführung von Applikationen in starker Weise vom Erwachen der Tiere überlagert. Vielleicht können durch die Verlagerung der Messung auf die Aktivitätsperiode informativere Ergebnisse erhalten werden. Untersuchungen in diese Richtung sind schwierig, da sie entweder in eigenen abgeschirmten Haltungsbereichen durchgeführt werden müssen, in denen die Tiere ein Licht-Dunkel-Regiment erhalten, bei dem die Dunkelperiode der Tiere auf den Arbeitstag des Personals gelegt wird. Falls diese aufwendige organisatorische Maßnahme nicht möglich ist, müssen die Untersuchungen auf die Nacht gelegt werden, was eine erhebliche Belastung des durchführenden Personals mit sich bringt. Trotz der experimentellen Schwierigkeiten signalisieren unsere präliminären Daten aber, dass Belastungsmessungen von Mäusen in deren Aktivitätsperiode lohnend sein könnten.

6 Zusammenfassung

Tierversuche werden in der Gesellschaft in ambivalenter Weise gesehen und sind ethisch umstritten. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass die nationale und europäische Politik die Tierschutzgesetzgebung kontinuierlich verschärft. Ein besonderer Schwerpunkt kommt dabei der strikten Einhaltung des sogenannten 3R Konzeptes zu, nach dem Tierversuche möglichst zu ersetzen (replace), die Versuchstierzahlen zu minimieren (reduce) und die am Tier eingesetzten Techniken zu verfeinern (refine) sind. Aktuell fehlen jedoch insbesondere für Mäuse, die am häufigsten für Tierversuche eingesetzt werden, einheitliche robuste Standards, um Schmerz und Leiden zu erfassen.

Weil Schmerzen und Leiden von Labortieren nicht direkt beurteilt werden können, muss eine Einschätzung indirekt über physiologische Parameter oder klinische Beobachtungen erfolgen. Parameter, die einerseits zuverlässig mit der Empfindung von Schmerz und Leiden bei Tieren einhergehen und die andererseits objektiv durch einen menschlichen Beobachter quantifiziert werden können, müssen vorzugsweise für eine solche Beurteilung in Betracht gezogen werden. Die komplexen neuronalen und neurohumoralen Reaktionen von Tieren, die als Stressreaktion bezeichnet werden und nahezu von allen Reizen oder Stressoren induziert werden, werden als besonders robuste Indikatoren für Schmerz und Leiden angesehen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Belastung von Mäusen durch einmalig durchgeführte Applikationstechniken (subkutan, intravenös, intraperitoneal, intraplantar, retrobulbär und die Schlundsondierung) zu untersuchen. Zur Berücksichtigung möglicher genetischer Unterschiede wurden Mäuse der Stämme C57BL/ 6J, BALB/ c und NMRI in der Studie berücksichtigt. Die Injektionen und die Schlundsondierung können eine physische Stressreaktion induzieren, die durch das Eindringen in die Haut oder eine mögliche Gewebespannung durch die eingegebene Substanz initiiert wird. Sie beinhalten aber auch eine psychologische Stresskomponente, die durch die unvermeidliche Fixierung ausgelöst wird. Demzufolge haben wir Mäuse, die einer bloßen Fixierung unterzogen wurden, als Kontrolle für die Applikationstechniken eingesetzt. Die retrobulbäre Injektion musste unter Kurzzeitinhalationsnarkose durchgeführt werden, so dass die Möglichkeit besteht, dass diese Injektionstechnik durch pharmakologische Effekte der Anästhesie beeinflusst wird. Deshalb wurden in diesem Versuch lediglich anästhesierte Mäuse als Kontrollen verwendet.

Die Reaktionen der Tiere wurden bestimmt, indem Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität telemetrisch evaluiert und Corticosteronserumkonzentrationen gemessen wurden. Die telemetrisch ermittelten Parameter wurden durch eine Varianzanalyse ausgewertet. Dazu legten wir bestimmte Zeitintervalle (akute Phase, Arousalphase und circadianer Biorhyth-

mus) fest, die der Analyse unterzogen wurden, um einen Überblick über die mögliche zeitliche Belastungsentwicklung zu bekommen.

Die Mehrzahl der Untersuchungen wurde in der Inaktivitätsperiode (Tagphase) der nachtaktiven Labortiere durchgeführt, weil dies versuchstierkundliche Praxis ist. Ein erster Pilotversuch wurde jedoch in die Aktivitätsperiode (Nachtphase) der Mäuse gelegt.

Wir haben gezeigt, dass die in der Inaktivitätsperiode der Mäuse einmalig durchgeführte Applikationstechniken (subkutan, intravenös, intraperitoneal, intraplantar und Schlundsondierung) eine einheitliche Belastungsgruppe von Verfahren bilden, die durch eine raschen Steigerung von Herzfrequenz, Körpertemperatur und Aktivität mit einer anschließenden sukzessiven Normalisierung der Werte vor der Manipulation charakterisiert ist. Bei allen während der Tagperiode durchgeführten Applikationstechniken wird die Belastung alleine durch die psychologische Fixierungskomponente determiniert und nicht weiter durch den physischen Applikationsstress beeinflusst.

Dieses Ergebnis wurde durch die Analyse der Corticosteronserumkonzentrationen von intraplantar injizierten C57BL/ 6N Mäusen bestätigt.

Die induzierten maximalen Herzfrequenzwerte waren bei den C57BL/ 6J und NMRI Tieren höher (750 bis 800 Schläge pro Minute) als bei den BALB/ c Mäusen (650 bis 700 Schläge pro Minute). Die Zeit bis zur Normalisierung auf die Ausgangswerte betrug aber bei allen untersuchten Stämmen ca. eine Stunde.

Die kardiale Reaktion von C57BL/ 6J Mäusen war durch eine extrem hohe Tachykardie sowie ein stabiles Beibehalten dieser maximalen Herzfrequenzwerte über die gesamten 300 Sekunden nach der Manipulation gekennzeichnet, was auf eine anhaltende akute Sympathikusaktivierung hindeutet und eine eher niedrige Stressresistenz dieses Stammes widerspiegelt.

Die retrobulbäre Injektion von C57BL/ 6J Mäusen repräsentiert eine eigene Eingriffskategorie, die durch eine anästhesiebedingte signifikante Tachykardie und Hypothermie in den ersten 20 Minuten nach der Manipulation charakterisiert ist. Injizierte Mäuse zeigten ferner einen erheblichen Herzfrequenzanstieg in den 40 bis 80 Minuten nach der Manipulation im Vergleich zu den ausschließlich anästhesierten Kontrolltieren, was eine Schmerzreaktion darstellen kann, da die retrobulbäre Injektion mit peribulbärer Gewebeschädigung assoziiert ist.

In einem ersten Versuchsansatz haben wir die subkutane Injektion in der Dunkelperiode durchgeführt und in der post- prozeduralen Arousalphase einen signifikanten Unterschied der Herzfrequenz zwischen injizierten und lediglich fixierten Tieren erhalten. Da aber nur diese eine telemetrische Messung in der Dunkelperiode durchgeführt wurde, ist dieses Er-

gebnis vorsichtig zu interpretieren. Es sollten weitere Experimente durchgeführt werden, um zu eruieren, ob sich für die Aktivitätsphase der Tiere eventuell ein anderer Ergebnistrend ergibt als wir ihn in der Inaktivitätsperiode vorgefunden haben.

7 Summary

Evaluation of stress reactions of mice induced by routine application techniques using telemetric assessment of physiological reactions and analysis of corticosterone

Animal research is an ethically controversial topic, therefore the national and European policy continuously tighten the animal welfare legislation. There is a focus on the strict observance of the 3Rs concept which is meant to replace animal testing, reduce the number of tested animals, and refine the techniques used on animals. To date uniform robust standards to detect pain and suffering in animals are still lacking, especially for mice, one of the most commonly used species for animal research.

As pain and suffering in laboratory animals cannot be directly assessed, it must be evaluated indirectly by physiological parameters or clinical observations. Parameters which are reliably associated with pain and distress perception in animals, and can objectively be quantitated by the human observer, should be assessed preferentially. The complex neural and neuro-humoral reactions of animals, referred to as stress response, are induced by almost all stimuli or stressors, proven to be strong indicators for pain and distress assessment.

Our aim was to perform and evaluate the impact of singular application techniques on mice (subcutaneous, intravenous, intraperitoneal, intraplantar, retrobulbar and oral gavage respectively).

To consider possible genetic differences, different mice strains namely C57BL/ 6J, BALB / c and NMRI were used in this study.

Injections and gavage can induce physical stress reactions through skin penetration, cause potential tissue tensions by the applied solutions, and cause a psychological stress component resulting from the unavoidable animal restraint. Taking that into account, mice that were restrained only (restraint-based) without a consecutive application were used as controls. In contrast, retrobulbar injections were conducted under short term inhalation anesthesia which can be influenced by potential pharmacological effects of the anesthetic. As a consequence, we used merely anesthetized mice as controls for the (anesthesia-based) retrobulbar experiments.

Animal reactions were determined by telemetric heart rate, body temperature, activity, as well as serum corticosterone concentrations.

The majority of studies were carried out in the inactivity period (daytime) of nocturnal laboratory animals, as this reflects most accurately the laboratory animals' every day practice. A first pilot project was performed in the activity period of mice (night). The parameters were

determined and evaluated using analysis of the variances. We defined time intervals, acute phase, arousal phase and circadian biorhythm, in order to quantify an accurate impression of the potential temporal stress development.

Our results show that single injection techniques (subcutaneous, intravenous, intraperitoneal, intraplantar, retrobulbar and oral gavage) performed in the inactivity phase of restrained mice represent a uniform group of procedures which is characterized through an immediate heart rate, body temperature, activity arousal reaction, and successive normalization to pre-procedural values. In all the performed experiments the reactions were exclusively determined by the psychological restraint component and not influenced by the physical injection stress. This result was corroborated by analysis of the corticosterone serum secretion of intraplantar injected C57BL/ 6N mice. The peak heart rate values were higher for the C57BL/ 6J and NMRI strains (750 to 800 bpm) as compared to the BALB/ c variant (650 to 700 bpm), however duration of the normalization period was always in a range of approximately one hour. The cardiac reaction of C57BL/ 6J mice was not only characterized by high-level tachycardia but also by stable preservation of a maximum period of at least 300 seconds, pointing to an acute sympathetic excitatory phase and challenging the stress resistance of this strain.

The retrobulbar injection of C57BL/ 6J mice represented its own procedural category. This was characterized by a significant phase of tachycardia and hypothermia within the first 20 post- procedural minutes, clearly mediated by isoflurane anesthesia. Injected mice showed a significant heart rate elevation in the 40 to 80 post- procedural minutes as compared to anesthetized controls. This likely indicates a pain reaction since the injection was associated with peribulbar tissue damage.

In an additional first test approach we carried out the subcutaneous injection technique into the dark period and detected a single significance in the arousal phase of heart rate in the period after the manipulation. However, this was the only telemetric measurement examined in the dark period. Therefore, this result should be cautiously interpreted.

In conclusion we found that further research is needed to determine conclusive animal trends during the activity and inactivity period.

Literaturverzeichnis

- Abbott, A. 2010. Lab-animal battle reaches truce. *Nature*, 464, 964.
- Abu-Hijleh, M. F., Habbal, O. A. & Moqattash, S. T. 1995. The role of the diaphragm in lymphatic absorption from the peritoneal cavity. *J Anat*, 186 (Pt 3), 453-67.
- Aclam, T. f. m. 2007. Public statement: guidelines for the assessment and management of pain in rodents and rabbits. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 46, 97-108.
- Anisman, H., Lacosta, S., Kent, P., McIntyre, D. C. & Merali, Z. 1998. Stressor-induced corticotropin-releasing hormone, bombesin, ACTH and corticosterone variations in strains of mice differentially responsive to stressors. *Stress*, 2, 209-20.
- Arras, M., Rettich, A., Cinelli, P., Kasermann, H. P. & Burki, K. 2007a. Assessment of post-laparotomy pain in laboratory mice by telemetric recording of heart rate and heart rate variability. *BMC Vet Res*, 3, 16.
- Arras, M., Rettich, A., Seifert, B., Kasermann, H. P. & Rulicke, T. 2007b. Should laboratory mice be anaesthetized for tail biopsy? *Lab Anim*, 41, 30-45.
- Augustsson, H., Dahlborn, K. & Meyerson, B. J. 2005. Exploration and risk assessment in female wild house mice (*Mus musculus musculus*) and two laboratory strains. *Physiol Behav*, 84, 265-77.
- Axelrod, J. & Reisine, T. D. 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, 224, 452-9.
- Balcombe, J. P., Barnard, N. D. & Sandusky, C. 2004. Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 43, 42-51.
- Banks, E. M. 1982. Behavioral research to answer questions about animal welfare. *J Anim Sci*, 54, 434-46.
- Barrot, M. 2012. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience*, 211, 39-50.
- Baumans, V. 2004. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? *Gene Ther*, 11 Suppl 1, S64-6.
- Beck, J. A., Lloyd, S., Hafezparast, M., Lennon-Pierce, M., Eppig, J. T., Festing, M. F. & Fisher, E. M. 2000. Genealogies of mouse inbred strains. *Nat Genet*, 24, 23-5.
- Belzung, C. & Griebel, G. 2001. Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. *Behav Brain Res*, 125, 141-9.
- Benedetti, M., Merino, R., Kusuda, R., Ravanelli, M. I., Cadetti, F., dos Santos, P., Zanon, S. & Lucas, G. 2012. Plasma corticosterone levels in mouse models of pain. *Eur J Pain*, 16, 803-15.
- Bernatova, I., Key, M. P., Lucot, J. B. & Morris, M. 2002. Circadian differences in stress-induced pressor reactivity in mice. *Hypertension*, 40, 768-73.
- Birkhofer, A., Schmidt, G. & Forstl, H. 2005. [Heart and brain -- the influence of psychiatric disorders and their therapy on the heart rate variability]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 73, 192-205.

- BMEL, B. f. E. u. L. 2015. *Anzahl der im Jahr 2014 für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere* [Online]. http://www.bmel.de/SharedDocs/Downloads/Tier/Tierschutz/2014-TierversuchszahlenGesamt.pdf?__blob=publicationFile.
- Breazile, J. E. 1987. Physiologic basis and consequences of distress in animals. *J Am Vet Med Assoc*, 191, 1212-5.
- Breedlove, S. M., Rosenzweig, M. R. & Watson, N. V. 2007. *Biological Psychology: An Introduction to Behavioral, Cognitive, and Clinical Neuroscience*, Sinauer Associates, Inc.
- Broom, D. M. & Johnson, K. G. 1993. *Stress and animal welfare*, Kluwer Academic Publishers.
- Butz, G. M. & Davisson, R. L. 2001. Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: a physiological genomics tool. *Physiol Genomics*, 5, 89-97.
- Cannon, W. B. 1932. *Wisdom of the Body*, United States: W.W. Norton & Company.
- Carson, V. G., Kado, R. T. & Wenzel, B. M. 1972. A telemeter for monitoring the electrocardiograms of freely moving mice. *Physiol Behav*, 8, 561-3.
- Cesarovic, N., Jirkof, P., Rettich, A. & Arras, M. 2011. Implantation of radiotelemetry transmitters yielding data on ECG, heart rate, core body temperature and activity in free-moving laboratory mice. *J Vis Exp*.
- Chrousos, G. P. & Gold, P. W. 1992. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, 267, 1244-52.
- Cinelli, P., Rettich, A., Seifert, B., Burki, K. & Arras, M. 2007. Comparative analysis and physiological impact of different tissue biopsy methodologies used for the genotyping of laboratory mice. *Lab Anim*, 41, 174-84.
- Clement, J. G., Mills, P. & Brockway, B. 1989. Use of telemetry to record body temperature and activity in mice. *J Pharmacol Methods*, 21, 129-40.
- Cochran, W. W. & Lord, J., R. D. 1963. A Radio-Tracking System for Wild Animals. *The Journal of Wildlife Management* 27, 9-24.
- Coria-Avila, G. A., Gavrilu, A. M., Menard, S., Ismail, N. & Pfaus, J. G. 2007. Cecum location in rats and the implications for intraperitoneal injections. *Lab Anim (NY)*, 36, 25-30.
- Crabbe, J. C., Wahlsten, D. & Dudek, B. C. 1999. Genetics of mouse behavior: interactions with laboratory environment. *Science*, 284, 1670-2.
- Cressey, D. 2008. Proposed animal research reforms spark concern in Europe. *Nat Med*, 14, 1293.
- Dalm, S., Enthoven, L., Meijer, O. C., van der Mark, M. H., Karssen, A. M., de Kloet, E. R. & Oitzl, M. S. 2005. Age-related changes in hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity of male C57BL/6J mice. *Neuroendocrinology*, 81, 372-80.
- de Jong, W. H., Timmerman, A. & van Raaij, M. T. 2001. Long-term cannulation of the vena cava of rats for blood sampling: local and systemic effects observed by histopathology after six weeks of cannulation. *Lab Anim*, 35, 243-8.
- de Kloet, E. R., Joels, M. & Holsboer, F. 2005. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 6, 463-75.

- Diehl, K. H., Hull, R., Morton, D., Pfister, R., Rabemampianina, Y., Smith, D., Vidal, J. M., van de Vorstenbosch, C., European Federation of Pharmaceutical Industries, A. & European Centre for the Validation of Alternative, M. 2001. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*, 21, 15-23.
- FELASA 1994. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992. *Lab Anim*, 28, 97-112.
- Flecknell, P. A. 2009. *Laboratory Animal Anaesthesia* Elsevier.
- Foltz, C. J. & Ullman-Cullere, M. H. 1999. Guidelines for Assessing the Health and Condition of Mice. *Lab Animal* 28, 28-32.
- Fox, J. G., Barthold, S. W., Davisson, M. T., Newcomer, C. E., Quimby, F. W. & Smith, A. I. 2007. *The Mouse in Biomedical Research: Normative Biology, Husbandry, and Models*, Academic Press.
- Ganong, W. F. 1988. The stress response--a dynamic overview. *Hosp Pract (Off Ed)*, 23, 155-8, 161-2, 167 passim.
- Gaskill, B. N., Karas, A. Z., Garner, J. P. & Pritchett-Corning, K. R. 2013. Nest building as an indicator of health and welfare in laboratory mice. *J Vis Exp*, 51012.
- Goldstein, D. S. 2003. Catecholamines and stress. *Endocr Regul*, 37, 69-80.
- Gotloib, L., Wajsbrot, V. & Shostak, A. 2005. A short review of experimental peritoneal sclerosis: from mice to men. *Int J Artif Organs*, 28, 97-104.
- Griebel, G., Belzung, C., Perrault, G. & Sanger, D. J. 2000. Differences in anxiety-related behaviours and in sensitivity to diazepam in inbred and outbred strains of mice. *Psychopharmacology (Berl)*, 148, 164-70.
- Grouzmann, E., Cavadas, C., Grand, D., Moratel, M., Aubert, J. F., Brunner, H. R. & Mazzolai, L. 2003. Blood sampling methodology is crucial for precise measurement of plasma catecholamines concentrations in mice. *Pflugers Arch*, 447, 254-8.
- Gunnar, M. & Quevedo, K. 2007. The neurobiology of stress and development. *Annu Rev Psychol*, 58, 145-73.
- GV-SOLAS 2012. Stellungnahme aus dem Ausschuss für Tierschutzbeauftragte zur Applikation in den retrobulbären Venenplexus bei Mäusen.
- GV-SOLAS, A. f. T. i. d., und & TVT2, A. i. d. 2010. Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren.
- Hackbarth, H. & Lückert, A. 2000. *Tierschutzrecht- Praxisorientierter Leitfaden*, München, Jehle.
- Harkin, A., Connor, T. J., O'Donnell, J. M. & Kelly, J. P. 2002. Physiological and behavioral responses to stress: what does a rat find stressful? *Lab Anim (NY)*, 31, 42-50.
- Hawkins, P. 2002. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. *Lab Anim*, 36, 378-95.

- Henke, J., Erhardt, W. & Tacke, S. 2008. Analgesieprotokolle vor, während und nach der Anästhesie von Hunden und Katzen mit schmerzhaften Zuständen - Eine Übersicht. *Tierärztliche Praxis Kleintiere*, 1, 27-34.
- Hickman, D. L. & Swan, M. 2010. Use of a body condition score technique to assess health status in a rat model of polycystic kidney disease. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 49, 155-9.
- Hobfoll, S. E. 1989. Conservation of resources. A new attempt at conceptualizing stress. *Am Psychol*, 44, 513-24.
- Hutten, H. 1973. *Biotelemetrie, Angewandte biomedizinische Technik*, Berlin, Heidelberg, New York Springer Verlag.
- IASP 1994. *Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms* Seattle, IASP Press.
- ILAR 1992. *Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals*, Washington DC, National Academies Press.
- ILAS 1992. *Recognition and Alleviation of Pain and Distress in Laboratory Animals*. Washington (DC).
- Ilback, N. G., Siller, M. & Stalhandske, T. 2008. Effects of buprenorphine on body temperature, locomotor activity and cardiovascular function when assessed by telemetric monitoring in rats. *Lab Anim*, 42, 149-60.
- Jackson, L. R. & Fox, J. G. 1995. Institutional Policies and Guidelines on Adjuvants and Antibody Production. *ILAR J*, 37, 141-152.
- Jirkof, P. 2014. Burrowing and nest building behavior as indicators of well-being in mice. *J Neurosci Methods*, 234, 139-46.
- Jirkof, P., Cesarovic, N., Rettich, A., Nicholls, F., Seifert, B. & Arras, M. 2010. Burrowing behavior as an indicator of post-laparotomy pain in mice. *Front Behav Neurosci*, 4, 165.
- Juruena, M. F., Cleare, A. J. & Pariante, C. M. 2004. [The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression]. *Rev Bras Psiquiatr*, 26, 189-201.
- Kagan, L., Gershkovich, P., Mendelman, A., Amsili, S., Ezov, N. & Hoffman, A. 2007. The role of the lymphatic system in subcutaneous absorption of macromolecules in the rat model. *Eur J Pharm Biopharm*, 67, 759-65.
- Kamala, T. 2007. Hock immunization: a humane alternative to mouse footpad injections. *J Immunol Methods*, 328, 204-14.
- Kawashima, Y., Sugimura, M., Hwang, Y.-C. & Kudo, N. 1964. The Lymph System in Mice. *Japanese Journal of Veterinary Research*, 12, 69-78.
- Kimmich, H. P. 1980. Artifact free measurement of biological parameters: biotelemetry, a historical review and layout of modern developments *In: AMLANDER, C. J. & MAC DONALD, D. W. (eds.) A Handbook on Biotelemetry and Radio Tracking*. Pergamon Press.

- Kramer, K., Kinter, L., Brockway, B. P., Voss, H. P., Remie, R. & Van Zutphen, B. L. 2001. The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 40, 8-16.
- Kramer, K. & Kinter, L. B. 2003. Evaluation and applications of radiotelemetry in small laboratory animals. *Physiol Genomics*, 13, 197-205.
- Kramer, K., van Acker, S. A., Voss, H. P., Grimbergen, J. A., van der Vijgh, W. J. & Bast, A. 1993. Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 30, 209-15.
- Kränzlin, B., Schock- Kusch, D., Skude, V., Reitz, N., Beisele, M. & Gretz, N. 2013. Pathohistological changes after retrobulbar injection. Posterpräsentation: 12th FELASA SECAL Congress.
- Kretlow, A., Butzke, D., Goetz, M. E., Grune, B., Halder, M., Henkler, F., Liebsch, M., Nobiling, R., Oelgeschlaeger, M., Reifenberg, K., Schaefer, B., Seiler, A. & Luch, A. 2010. Implementation and enforcement of the 3Rs principle in the field of transgenic animals used for scientific purposes. Report and recommendations of the BfR expert workshop, May 18-20, 2009, Berlin, Germany. *ALTEX*, 27, 117-34.
- Kvetnansky, R., Sabban, E. L. & Palkovits, M. 2009. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*, 89, 535-606.
- Langford, D. J., Bailey, A. L., Chanda, M. L., Clarke, S. E., Drummond, T. E., Echols, S., Glick, S., Ingrao, J., Klassen-Ross, T., Lacroix-Fralish, M. L., Matsumiya, L., Sorge, R. E., Sotocinal, S. G., Tabaka, J. M., Wong, D., van den Maagdenberg, A. M., Ferrari, M. D., Craig, K. D. & Mogil, J. S. 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*, 7, 447-9.
- Le Bars, D., Gozariu, M. & Cadden, S. W. 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*, 53, 597-652.
- Leach, M. C., Klaus, K., Miller, A. L., Scotto di Perrotolo, M., Sotocinal, S. G. & Flecknell, P. A. 2012. The assessment of post-vasectomy pain in mice using behaviour and the Mouse Grimace Scale. *PLoS One*, 7, e35656.
- Leon, L. R., Walker, L. D., DuBose, D. A. & Stephenson, L. A. 2004. Biotelemetry transmitter implantation in rodents: impact on growth and circadian rhythms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 286, R967-74.
- Li, P., Sur, S. H., Mistlberger, R. E. & Morris, M. 1999. Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice. *Am J Physiol*, 276, R500-4.
- Lindsay, R. & Voith, V. L. 2000. *Handbook of applied dog behavior and training* Iowa State University Press, Iowa.
- Loijens, L. W., Janssens, C. J., Schouten, W. G. & Wiegant, V. M. 2002. Opioid activity in behavioral and heart rate responses of tethered pigs to acute stress. *Physiol Behav*, 75, 621-6.
- Lorz, A. 1992. *Tierschutzgesetz- Kommentar*, München, C.H. Beck Verlagsbuchhandlung.
- Lorz, A. & Metzger, E. 1999. *Tierschutzgesetz*, München, C. H. Beck Verlagsbuchhandlung.
- Lukas, G., Brindle, S. D. & Greengard, P. 1971. The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. *J Pharmacol Exp Ther*, 178, 562-4.

- Malakoff, D. 2000. The rise of the mouse, biomedicine's model mammal. *Science*, 288, 248-53.
- Marris, E. 2009. More pain studies needed. *Nature*, 458, 394-5.
- Matteri, R. L., Carrol, J. A. & Dyer, C. J. 2000. *Neuroendocrine Response to Stress in The Biology of Animal Stress – Basic Principles and Implications for Animal Welfare.*, CABI Publishing, New York,.
- Mc Ewen, B. S. & Sapolsky, R. M. 1995. Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol*, 5, 205-16.
- Mc Grath, J. E. 1970. *Social and psychological factors in stress*, Holt, Rinehart and Winston, New York.
- Meijer, M. K., Sommer, R., Spruijt, B. M., van Zutphen, L. F. & Baumans, V. 2007. Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. *Lab Anim*, 41, 161-73.
- Miller, G. E., Chen, E. & Zhou, E. S. 2007. If it goes up, must it come down? Chronic stress and the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in humans. *Psychol Bull*, 133, 25-45.
- Miner, N. A., Koehler, J. & Greenaway, L. 1969. Intraperitoneal injection of mice. *Appl Microbiol*, 17, 250-1.
- Moberg, G. P. 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG, G. P., MENCH, J. A. (ed.) *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing, New York.
- Molony, V. & Kent, J. E. 1997. Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements. *J Anim Sci*, 75, 266-72.
- Morton, D. B. & Griffiths, P. H. 1985. Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec*, 116, 431-6.
- Morton, D. B., Jennings, M., Buckwell, A., Ewbank, R., Godfrey, C., Holgate, B., Inglis, I., James, R., Page, C., Sharman, I., Verschoyle, R., Westall, L., Wilson, A. B. & Joint Working Group on, R. 2001. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. *Lab Anim*, 35, 1-41.
- Möstl, E. 2000. *Spezielle Endokrinologie in Physiologie der Haustiere*, Enke Verlag, Stuttgart.
- Murrell, J. C. & Johnson, C. B. 2006. Neurophysiological techniques to assess pain in animals. *J Vet Pharmacol Ther*, 29, 325-35.
- Nakata, T., Berard, W., Kogosov, E. & Alexander, N. 1993. Cardiovascular change and hypothalamic norepinephrine release in response to environmental stress. *Am J Physiol*, 264, R784-9.
- Nijssen, M. J., Ongenae, N. G., Coulie, B. & Meulemans, A. L. 2003. Telemetric animal model to evaluate visceral pain in the freely moving rat. *Pain*, 105, 115-23.

- Ohman, A. & Mineka, S. 2001. Fears, phobias, and preparedness: toward an evolved module of fear and fear learning. *Psychol Rev*, 108, 483-522.
- Olfert, E. D. 1995. Defining an Acceptable Endpoint in Invasive Experiments. *Animal Welfare Information Center Newsletter* 6, 3-7.
- Palme, R. 2005. Measuring fecal steroids: guidelines for practical application. *Ann N Y Acad Sci*, 1046, 75-80.
- Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, S. M. & Mostl, E. 2005. Stress hormones in mammals and birds: comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Ann N Y Acad Sci*, 1040, 162-71.
- Partch, C. L., Green, C. B. & Takahashi, J. S. 2014. Molecular architecture of the mammalian circadian clock. *Trends Cell Biol*, 24, 90-9.
- Pawlyk, A. C., Morrison, A. R., Ross, R. J. & Brennan, F. X. 2008. Stress-induced changes in sleep in rodents: models and mechanisms. *Neurosci Biobehav Rev*, 32, 99-117.
- Picciotto, M. R. & Self, D. W. 1999. Testing the genetics of behavior in mice. *Science*, 285, 2067; author reply 2069-70.
- Pihl, L. & Hau, J. 2003. Faecal corticosterone and immunoglobulin A in young adult rats. *Lab Anim*, 37, 166-71.
- Pschyrembel, W. 2007. *Pschyrembel® Klinisches Wörterbuch* Berlin und New York, De Gruyter.
- Quesenberry, K. & Carpenter, J. W. 2004. *Ferrets, Rabbits, and Rodents: Clinical Medicine and Surgery* Saunders.
- Rensing, L., Koch, M., Rippe, B. & Rippe, V. 2006. *Mensch im Stress: Psyche, Körper, Moleküle*, Springer Spektrum.
- Rettich, A., Kasermann, H. P., Pelczar, P., Burki, K. & Arras, M. 2006. The physiological and behavioral impact of sensory contact among unfamiliar adult mice in the laboratory. *J Appl Anim Welf Sci*, 9, 277-88.
- Royo, F., Bjork, N., Carlsson, H. E., Mayo, S. & Hau, J. 2004. Impact of chronic catheterization and automated blood sampling (Accusampler) on serum corticosterone and fecal immunoreactive corticosterone metabolites and immunoglobulin A in male rats. *J Endocrinol*, 180, 145-53.
- Russel, W. M. S. & Burch, R. L. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*, Methuen, London.
- Sanford, J., Ewbank, R., Molony, V. & Uvarov, O. 1986. Guidelines for the recognition and assessment of pain in animals. *Vet. Record*, 118, 334-338.
- Schaefer, D. C., Asner, I. N., Seifert, B., Burki, K. & Cinelli, P. 2010. Analysis of physiological and behavioural parameters in mice after toe clipping as newborns. *Lab Anim*, 44, 7-13.
- Schandry, R. 2006. *Biologische Psychologie: Ein Lehrbuch*, Beltz, Weinheim; Auflage: 2., überarbeitete Aufl.
- Selye, H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J*, 1, 1383-92.
- Selye, H. 1974. *Stress without distress*, New York, New America Library.

- Smith, S. M. & Vale, W. W. 2006. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin Neurosci*, 8, 383-95.
- Sousa, N., Almeida, O. F. & Wotjak, C. T. 2006. A hitchhiker's guide to behavioral analysis in laboratory rodents. *Genes Brain Behav*, 5 Suppl 2, 5-24.
- Spani, D., Arras, M., Konig, B. & Rulicke, T. 2003. Higher heart rate of laboratory mice housed individually vs in pairs. *Lab Anim*, 37, 54-62.
- Stasiak, K. L., Maul, D., French, E., Hellyer, P. W. & VandeWoude, S. 2003. Species-specific assessment of pain in laboratory animals. *Contemp Top Lab Anim Sci*, 42, 13-20.
- Steel, C. D., Stephens, A. L., Hahto, S. M., Singletary, S. J. & Ciavarrà, R. P. 2008. Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus as routes of intravenous drug delivery in a transgenic mouse model. *Lab Anim (NY)*, 37, 26-32.
- Tannenbaum, B. & Anisman, H. 2003. Impact of chronic intermittent challenges in stressor-susceptible and resilient strains of mice. *Biol Psychiatry*, 53, 292-303.
- Thayer, J. F., Ahs, F., Fredrikson, M., Sollers, J. J., 3rd & Wager, T. D. 2012. A meta-analysis of heart rate variability and neuroimaging studies: implications for heart rate variability as a marker of stress and health. *Neurosci Biobehav Rev*, 36, 747-56.
- Tilney, N. L. 1971. Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J Anat*, 109, 369-83.
- Touma, C. & Palme, R. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: the importance of validation. *Ann N Y Acad Sci*, 1046, 54-74.
- Touma, C., Palme, R. & Sachser, N. 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Horm Behav*, 45, 10-22.
- Touma, C., Sachser, N., Mostl, E. & Palme, R. 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *Gen Comp Endocrinol*, 130, 267-78.
- Turner, P. V., Brabb, T., Pekow, C. & Vasbinder, M. A. 2011. Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 50, 600-13.
- Ullman-Cullere, M. H. & Foltz, C. J. 1999. Body condition scoring: a rapid and accurate method for assessing health status in mice. *Lab Anim Sci*, 49, 319-23.
- Ulrich-Lai, Y. M. & Herman, J. P. 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*, 10, 397-409.
- Vahl, T. P., Ulrich-Lai, Y. M., Ostrander, M. M., Dolgas, C. M., Elfers, E. E., Seeley, R. J., D'Alessio, D. A. & Herman, J. P. 2005. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 289, E823-8.
- Van den Broeck, W., Derore, A. & Simoens, P. 2006. Anatomy and nomenclature of murine lymph nodes: Descriptive study and nomenclatory standardization in BALB/cAnNCrl mice. *J Immunol Methods*, 312, 12-9.

- van den Buuse, M., Van Acker, S. A., Fluttert, M. & De Kloet, E. R. 2001. Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological "novelty" stress in freely moving rats. *Psychophysiology*, 38, 490-9.
- Van Reenen, C. G., Van der Werf, J. T., Bruckmaier, R. M., Hopster, H., Engel, B., Noordhuizen, J. P. & Blokhuis, H. J. 2002. Individual differences in behavioral and physiological responsiveness of primiparous dairy cows to machine milking. *J Dairy Sci*, 85, 2551-61.
- Van Zutphen, L. F. M., Baumans, V. & Beynen, A. C. 1995. *Grundlagen der Versuchstierkunde*, Stuttgart, Jena, New York, Gustav Fischer.
- Vogel, G. 2010. Animal research. Long-fought compromise reached on European animal rules. *Science*, 329, 1588-9.
- Weiss, J., Becker, K., Bernsmann, E., Chourbaji, S. & Dietrich, H. 2014. *Versuchstierkunde: Tierpflege in Forschung und Klinik*, Enke.
- Wells, D. J. 2011. Animal welfare and the 3Rs in European biomedical research. *Ann N Y Acad Sci*, 1245, 14-6.
- Yardeni, T., Eckhaus, M., Morris, H. D., Huizing, M. & Hoogstraten-Miller, S. 2011. Retro-orbital injections in mice. *Lab Anim (NY)*, 40, 155-60.
- Zimmermann, M. 1986. Behavioural investigations of pain in animals. In: DUNCAN, I. J. H. & MOLONY, V. (eds.) *Assesing pain in farm animals*. Luxemburg: Office for Official Publications of the European Communities.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfsmittel in Anspruch genommen habe.

Ort, Datum

Nina Baier, geb. Reitz

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Dr. Michael Erhard für die Übernahme meiner Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig- Maximilian Universität München und die Hilfe bei der Fertigstellung der Arbeit bedanken.

Mein großer Dank für die Überlassung dieses interessanten und wichtigen Themas gilt meinem wissenschaftlichen Betreuer Herrn Prof. Dr. Kurt Reifenberg, der mir mit wertvollen Anmerkungen zur Planung und Auswertung meiner Arbeit eine sehr große Hilfe war und mir besonders bei der Fertigstellung der Arbeit immer mit konstruktiven Ratschlägen zur Seite stand.

Vielen Dank an Dr. Maike Beisele, die mich überhaupt zu dieser Arbeit gebracht hat und mir in der ersten, sehr wichtigen Zeit bei der Versuchsplanung und – durchführung sehr viel geholfen hat. Danke für diese schöne gemeinsame Zeit, Maike.

Dr. Nora Denk danke ich für die immer motivierenden Worte, die Hilfe und die Zeit am sehr frühen Morgen sowohl im Tierraum als auch im Labor. Danke für Deine freundschaftliche Unterstützung.

Ein ganz herzliches Dankeschön an die Tierpfleger sowohl von der Universitätsmedizin in Mainz als auch vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg für die viele Unterstützung. Ganz besonders möchte ich dabei Christiane Steige und Thomas Wacker, sowie Sarah Hess und Marko Eichler danken, die mich so sehr unterstützt haben mit ihrer wertvollen Hilfe und einigen Zusatzarbeiten für mich.

Danke an alle Kollegen der ZVTE in Mainz und am ZPF in Heidelberg, besonders an mein mikrobiologisches Labor, welches mir jeden Tag den Arbeitsalltag so angenehm gemacht hat. Es war eine tolle Zeit bei Euch.

Vielen Dank an Dr. Tim Holland- Letz für die große Hilfe und Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Versuche.

Mein ganz großer besonderer Dank gilt meiner Familie, die einen lang Weg mit mir bis zur Fertigstellung dieser Arbeit gegangen ist und mich dabei immer in allen Bereichen unterstützt hat. Ich danke Euch, Mama, Papa, Freddy und Oma Inge Rose besonders für alles, immer.

Danke Matthias Sander für Deine Freundschaft, Deine große Excelhilfe und für die immer wieder motivierenden Worte, damit dieses Kapitel einen Abschluss finden kann.

Danke an meine wichtigsten Mitarbeiter, die Mäuse, die ihr Leben für dieses Forschungsprojekt gelassen haben.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei der Stiftung Rheinland- Pfalz für Innovation für die Finanzierung dieser Arbeit bedanken.